



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS DE LA EMPRESA GINSBERG S.A.”

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

EVA JULIETA GUAMÁN MUELA

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

El presente proyecto de tesis lo dedico a Dios, mi apoyo incondicional, quién me provee de fuerza diaria para cumplir las metas de mi vida, A mis padres: Milton Benito Guamán y Ana Lucía Muela por ser claros ejemplos de constancia y perseverancia.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por los conocimientos impartidos en sus aulas, los mismos que han sido y serán de gran utilidad en mi desarrollo profesional.

A la Industria Farmacéutica Ginsberg Ecuador S.A por la apertura y apoyo constante en la ejecución del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Pilamunga por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis

Al BQF. Fausto Contero y al QA. Pedro Torres por dar asesoramiento y guía

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS DE LA EMPRESA GINSBERG S.A.”**, de responsabilidad de la señorita egresada Eva Julieta Guamán Muela , ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. César Ávalos
DECANO FAC. CIENCIAS

Dra. Ana Albuja
DIRECTORA DE ESCUELA

Dr. Carlos Pilamunga
DIRECTOR DE TESIS

B.Q.F. Fausto Contero
MIEMBRO DE TRIBUNAL

MIEMBRO DE TRIBUNAL

DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACION

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, (Eva Julieta Guamán Muela), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

(EVA JULIETA GUAMÁN MUELA)

RESUMEN

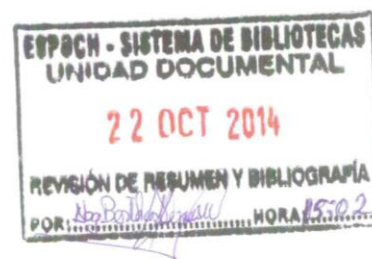
El objetivo de la presente investigación es validar el método analítico utilizado para la valoración de Vitamina A acetato por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del producto farmacéutico Retinol 50000 UI comprimidos de la empresa GINSBERG S.A. de la ciudad de Quito, con la finalidad de garantizar la calidad y seguridad del medicamento al paciente, a través de la identificación, cuantificación del principio activo, garantizando que se encuentre en la dosis adecuada para que cumpla su meta terapéutica.

Por lo cual organismos internacionales proponen analizar los siguientes parámetros de validación como: la linealidad del método analítico, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9998 y un CV de 0.71% para la exactitud del método se obtuvo un CV de 0.32%. En cuanto al rango determinado para la validación fueron a concentraciones del 60 y 140% logrando un CV de 0.55% y un 0.09% respectivamente. Encontrándose cada uno de estos resultados debajo de los criterios de aceptación que es $\leq 2\%$.

En cuanto a la precisión del método analizado a través de la repetibilidad se obtuvo un CV de 0.11% y una % de recuperación de 98.45%, para la reproducibilidad entre analista se logró un 99.07% de recuperación con un CV de 0.67% que se encuentran dentro del rango permitido del 90-125% y el CV $\leq 2\%$.

Los resultados obtenidos para la estabilidad, una vez transcurrido las muestras a 4 horas a temperatura ambiente, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 89.46% y un CV de 0.11%, hallándose dentro del 85-95% y por debajo del 2%, que son los valores de referencia permitidos. En lo que respecta a la especificidad, el método no muestra interferencias frente al placebo, fase móvil y solvente. Y por última instancia se determinó el límite de detección que es de 0.152 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación de 0.011 $\mu\text{g/ml}$, lo que significa que bajo las condiciones de operación establecidas; el método analítico validado detectará y cuantificará dichos valores.

En conclusión el método analítico cumple con los criterios de aceptación de los parámetros de validación, por lo que se considera validado y se recomienda su aplicación para garantizar la seguridad y calidad de los productos farmacéuticos.



SUMMARY

The objective of this research is to validate the analytical method used for the assessment of vitamin A acetate by high performance liquid chromatography (HPLC) of pills of pharmaceutical product Retinol 50000 IU of Company GINSBERG SA of Quito, in order to ensure the quality and safety of the drug to the patient, through the identification, quantification of the active substance, ensuring you are in the dose is correct to meet is therapeutic goal.

Therefore, international agencies propose to analyze the following validation parameters such as: linearity of the analytical method, obtaining a correlation coefficient of 0.9998 and a CV of 0.71% for the accuracy of the method a CV of 0.32% was obtained. Regarding the range determined for validation, concentrations of 60% and 140% was found achieving a CV of 0.55% and 0.09% respectively. Finding each of these results below the acceptance criteria is $\leq 2\%$.

As for the accuracy of the analyzed method through the repeatability it was obtained a CV of 0.11% and a % of recovery of 98.45%, for reproducibility between analyst 99.07% recovery was achieved with a CV of 0.67% which is within the allowed range of 90-125% and $CV \leq 2\%$.

After the laps of 4 hours at room temperature it was obtained 89.46% as percentage of recovery and a CV of 0.11% for results of stability being within 85-95% and below 2%, which is the reference values permitted. With regard to specificity, the method shows no interference versus placebo, mobile phase and solvent. And ultimately the detection limit is 0.152 mg / ml and the limit of quantification of 0.011 mg / ml was determined, which means that under the agreed terms of operation; the validated analytical method will detect and quantify these values.

In conclusion, the analytical method meets the acceptance criteria of the validation parameters so it is considered validated, and it is recommended to be applied to ensure the implemented the safety and quality of pharmaceutical products.



INDICES

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
INDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	1
1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 INFORMACIÓN GENERAL GINSBERG ECUADOR S.A	1
1.2 ÁREA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD	2
1.3 ÁREA DE VALIDACIONES	2
1.3.1 POLÍTICA DEL ÁREA DE VALIDACIONES.....	2
1.3.2 OBJETIVO DEL ÁREA DE VALIDACIONES.....	3
1.4 CONCEPTO DE VALIDACIÓN	4
1.4.1 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	4
1.4.2 REQUISITOS PARA DAR INICIO A UNA VALIDACIÓN	4
1.4.3 MÉTODOS SUSCEPTIBLES DE SER VALIDADOS.....	5
1.4.4 TIPOS DE VALIDACIÓN.....	5
1.4.4.1 Validación Retrospectiva.....	5
1.4.4.2 Validación Prospectiva.....	5
1.4.4.3 Validación Concurrente.....	6
1.4.4.4 Verificación.....	6
1.4.5 CATEGORÍAS DE LA VALIDACIÓN	6
1.4.5.1 Categoría I	6
1.4.5.2 Categoría II	6
1.4.5.3 Categoría III.....	7
1.4.5.4 Categoría IV.....	7
1.4.6 PROCESO DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	7
1.4.7 FASES EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO Y CRITERIOS DE VALIDACIÓN	9
1.4.7.1 Características de practicabilidad.....	9
1.4.7.2 Características de idoneidad	9
1.4.7.3 Características de fiabilidad.....	9

1.4.7.3.1	Selectividad	9
1.4.7.3.2	Linealidad.....	10
1.4.7.3.3	Rango	10
1.4.7.3.4	Repetibilidad	10
1.4.7.3.5	Precisión Intermedia	10
1.4.7.3.6	Reproducibilidad	10
1.4.7.3.7	Exactitud	11
1.4.7.3.8	Límite de cuantificación	11
1.4.7.3.9	Límite de detección.....	11
1.4.7.3.10	Robustez.....	11
1.4.8	DOCUMENTACIÓN EN EL ÁREA DE VALIDACIONES	13
1.4.8.1	Protocolo de Validación	13
1.4.8.2	Informe de Validación.....	13
1.4.8.3	Certificado de Validación	13
1.4.8.4	Status de Validación.....	14
1.5	CROMATOGRAFÍA.....	14
1.5.1	INTRODUCCIÓN	14
1.5.2	CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA.....	15
1.5.2.1	Cromatografía de adsorción.....	15
1.5.2.2	Cromatografía de reparto/adsorción.....	15
1.5.2.3	Cromatografía de intercambio iónico.....	15
1.5.2.4	Cromatografía de exclusión molecular.....	15
1.5.2.5	Cromatografía de Fase Normal	16
1.5.2.6	Cromatografía de Fase Inversa	16
1.5.3	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	16
1.5.3.1	Parámetros del HPLC	17
1.5.3.1.1	Diámetro interno de la columna	17
1.5.3.1.2	Medida de partículas.....	17
1.5.3.1.3	Tamaño del poro	17
1.5.3.1.4	Presión del sistema	17
1.5.3.2	Equipo para cromatografía de alta eficiencia	18
1.5.3.2.1	Dispositivos para la fase móvil	19
1.5.3.2.2	Bomba	19
1.5.3.2.3	Sistema de Inyección	20
1.5.3.2.4	Conducciones y Conexiones	20
1.5.3.2.5	Detector.....	21
1.5.3.2.5.1	Detector UV-visible	21
1.5.3.2.6	Columna	22
1.5.3.2.6.1	Columnas Atlantis.....	22
1.5.3.3	Elección de la Columna y Fase Móvil.....	22
1.6	VITAMINAS.....	24
1.6.1	INTRODUCCIÓN	24

1.6.2	CONCEPTO DE VITAMINAS	24
1.6.3	CLASIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS.....	25
1.6.3.1	Vitaminas Hidrosolubles	25
1.6.3.2	Vitaminas Liposolubles	26
1.6.4	RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS.....	26
1.6.4.1	Datos Generales del Producto.....	26
1.6.4.2	Composición y Especificaciones de los comprimidos RETINOL 50000 UI.....	27
1.6.4.3	Vía de Administración.....	28
1.6.4.4	Almacenamiento	28
1.6.4.5	Elaborado por.....	28
1.6.4.6	Descripción del principio activo Vitamina A acetato	28
1.6.4.7	Mecanismo de Acción	29
1.6.4.8	Farmacocinética	29
1.6.4.9	Indicaciones y Posología	30
1.6.4.10	Contraindicaciones	30
1.6.4.11	Interacciones	30
1.6.4.12	Reacciones Adversas.....	30
	CAPÍTULO II.....	31
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
2.1	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
2.1.1	CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
2.1.2	FACTORES DE ESTUDIO.....	32
2.1.3	MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.....	32
2.1.3.1	Lugar y Pruebas de Ensayo.....	32
2.2	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA VALORACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS COMPRIMIDOS DE RETINOL.....	33
2.2.1	TÍTULO: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS	33
2.2.1.1	Generalidades.....	33
2.2.1.2	Objetivo	33
2.2.1.3	Alcance	33
2.2.1.4	Responsabilidades	34
2.2.1.5	Método de Análisis	34
2.2.1.6	Fundamento	34
2.2.1.7	Equipos y Reactivos	35
2.2.1.8	Especificación Requerida	35
2.2.1.9	Condiciones de Operación.....	36
2.2.1.10	Preparación del estándar.....	36
2.2.1.11	Preparación de la muestra.....	37
2.2.1.12	Cálculos	37

2.2.1.13	Parámetros de Validación	38
2.2.1.14	Proceso de Validación	38
2.2.1.15	Criterios de Validación.....	39
2.2.1.15.1	Linealidad.....	39
2.2.1.15.2	Rango de trabajo.....	39
2.2.1.15.3	Exactitud	39
2.2.1.15.4	Precisión.....	40
2.2.1.15.5	Especificidad del método	40
2.2.1.15.6	Estabilidad de las soluciones analíticas	40
2.2.1.15.7	Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOC).....	41
2.2.1.16	Resultados.....	41
CAPÍTULO III.....		42
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4	CONCLUSIONES	54
5	RECOMENDACIONES	56
6	BIBLIOGRAFIA	58
7	ANEXOS.....	63

GLOSARIO

A _{st}	Área del estándar
AOAC	Asociación De Químicos Analíticos Oficiales
ARCSA	Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria
A _{st}	Área del estándar
A _m	Área de la muestra
ACN	Acetonitrilo
b	Intercepto de la curva de calibración
°C	Grados Celsius
CL	Cromatografía Líquida
CG	Cromatografía de Gases
Cp ^b	Viscosidad
C _{st}	Concentración estándar
C _{mt}	Concentración muestra
CV	Coeficiente de Variación
ϵ°	Fuerza Eluyente
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
LOC	Límite de Cuantificación
LOD	Límite de Detección
MSP	Ministerio de Salud Pública
Max.	Máximo
Min.	Mínimo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minutos
mm	milímetros

OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Índice de Polaridad
PP	Peso Promedio
p.a.	Principio activo
pH	Potencial Hidrógeno
psi	Pounds per Square Inch
r	Coeficiente de correlación
S.A.	Sociedad Anónima
S _{bl}	Desviación estándar de la respuesta a concentración cero
SD	Desviación estándar
USP	United States Pharmacopeia
tr	Tiempo de retención
W _{st}	Peso del estándar
W _m	Peso de la muestra
%P _{st}	Porcentaje “as is”
UI	Unidades Internacionales
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
R	Coeficiente de Correlación
μg	Microgramo
Y _{bl}	Respuesta a concentración cero

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1.	Parámetros de validación a analizar según el tipo de método analítico a validar.....	12
TABLA N°2.	Tipos de cromatografía.....	16
TABLA N°3	Lista de eluyentes más utilizados.....	23
TABLA N°4	Especificaciones de los comprimidos de RETINOL 50000 UI.....	27

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°1.	Resumen de los resultados obtenidos del proceso de validación para valoración de Vitamina A acetato.....	42
CUADRO N°2.	Análisis de la linealidad que presenta el método analítico para valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, 2014.....	43
CUADRO N°3.	Análisis de la concentración obtenida para el rango de 60% que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	45
CUADRO N°4.	Análisis de la concentración obtenida para el rango de 140% que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	46
CUADRO N°5.	Análisis de la exactitud que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	47
CUADRO N°6.	Análisis de la exactitud que presenta el método analítico, con tres concentraciones (80,100, 120%), en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	47
CUADRO N°7.	Análisis de la precisión que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	48
CUADRO N°8.	Análisis de la precisión (repetibilidad), que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	49

CUADRO N°9.	Análisis de la precisión (reproducibilidad), que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	50
CUADRO N°10.	Análisis de la especificidad del método analítico frente a los diferentes parámetros analizados.....	50
CUADRO N°11.	Análisis de la estabilidad, que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	51
CUADRO N°12.	Análisis de la linealidad del método analítico para la valoración de Vitamina A acetato para determinar el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOC).....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°1.	Esquema del HPLC (Equipo para cromatografía de alta eficiencia).....	19
GRÁFICO N°2.	Estructura del Retinol (Vitamina A).....	28
GRÁFICO N°3.	Representación gráfica de la linealidad que presenta el método analítico, en la valoración de Vitamina A, en Retinol comprimidos, realizado en el laboratorio de control de calidad, Empresa Farmacéutica GINSBERG Ecuador S.A, Quito, 2014.....	44
GRÁFICO N°4.	Representación gráfica de los límites de detección (LOD) y Límites de Cuantificación (LOC) para el método analítico en la valoración de Vitamina A acetato.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1.	Esquema representativo del proceso de validación.....	8
--------------------	---	---

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N°1.	Equipo de Cromatografía de alta eficiencia (HPLC).....86
FOTOGRAFÍA N°2.	Balanza OHAUS. Área Físico Química del Departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....87
FOTOGRAFÍA N°3.	Ultrasonido. Área Físico Química del Departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....87
FOTOGRAFÍA N°4.	Bomba al Vacío. Área Físico Química del Departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....87
FOTOGRAFÍA N°5.	Purificador de agua MILLI-Q® Área Físico Química del Departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....88
FOTOGRAFÍA N°6.	Comprimidos de Retinol producido por GINSBERG Ecuador S.A.....88
FOTOGRAFÍA N°7.	Documentos del proceso de Validación.....88
FOTOGRAFÍA N°8.	Hojas de trabajo utilizado en el proceso de Validación.....89
FOTOGRAFÍA N°9.	Preparación de muestras.....89

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL PROCESO DE VALIDACIÓN.....	63
ANEXO N°2.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL PROCESO DE VALIDACIÓN POR OTRO ANALISTA.....	67
ANEXO N°3.	CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE VITAMINA A ACETATO.....	68
ANEXO N.4	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 60%.....	69
ANEXO N.5	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 80%.....	70
ANEXO N.6	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 100%.....	71
ANEXO N.7	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 120%.....	72
ANEXO N.8	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 140%.....	73
ANEXO N.9	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA REPETIBILIDAD (PRECISIÓN).....	74
ANEXO N.10	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA REPRODUCIBILIDAD.....	75
ANEXO N.11	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA ESTABILIDAD.....	76
ANEXO N°12.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE A LA FASE MOVIL.....	77
ANEXO N°13.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE AL SOLVENTE.....	78

ANEXO N°14.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE AL PLACEBO.....	79
ANEXO N°15.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 10%.....	80
ANEXO N°16.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 20%.....	81
ANEXO N°17.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 30%.....	82
ANEXO N°18.	CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 40%.....	83
ANEXO N°19.	REVISIÓN TÉCNICA DEL PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.....	84
ANEXO N°20.	REVISIÓN TÉCNICA DEL INFORME DE VALIDACIÓN.....	85
ANEXO N°21.	CERTIFICADO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN.....	86

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las Industrias Farmacéuticas en el Ecuador han adquirido un gran avance en la elaboración, producción y comercialización de medicamentos en sus diferentes formas farmacéuticas destinados para la prevención y tratamiento de enfermedades. **(PAVON, A. 2011)**

Por lo cual es necesario un control riguroso en cada uno de los procesos de manufactura hasta la obtención de un producto terminado de óptima calidad e inocuidad y de esta forma a más de velar por la seguridad del consumidor, cumplir con los parámetros de calidad internos y externos exigidos por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) conjuntamente con el Ministerio de Salud Pública (MSP), Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Food and Drug Administration (FDA). **(VANCE, C. 2013)**

Por ello, hoy en día la FDA exige la validación de toda la cadena de producción de un medicamento, siendo estos procesos de: fabricación, limpieza, métodos analíticos, equipos, cuyo objetivo es velar por la seguridad del consumidor. **(BASEMAN, H y otros. 2011)**

Es por ello que las Industrias Farmacéuticas con el propósito de satisfacer estas necesidades, como las exigencias del consumidor y de las instituciones reguladoras, ha visto la importancia de organizar un área encargada de mantener evidencia documental que proporcione un alto grado de seguridad en la obtención de resultados precisos y exactos que cumplan con los parámetros exigidos, actividad que se logra a través de una validación rigurosa. **(PAVON, A. 2011)**

El punto clave de una validación es proporcionar una garantía de calidad. Muestra de ello es la Asociación De Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) un organismo encargado de promover excelencia analítica en la evaluación de los métodos analíticos, para lo cual propone parámetros de validación para métodos analíticos como son: precisión, exactitud, repetitividad, reproducibilidad, estabilidad, límites de cuantificación detección y linealidad. (SUÑE. J, 2001)

A través de ello, se pretende otorgar seguridad y garantía en los resultados. Al mismo tiempo una validación facilita un proceso de auditoría que trae beneficio tanto para la industria como para el paciente, reduciendo costes por errores en los productos, a más de disminuir número de rechazos, retratamiento y recontroles,⁵ al detectar puntos débiles en los procesos y al otorgar posibles soluciones encaminada a la mejora de la metodología de análisis de determinado principio activo. (PAVON, A. 2011)

Por ello, Ginsberg Ecuador S.A al ser una industria farmacéutica con alto grado de calidad, ha venido desarrollando procesos de validación, para lo cual cuenta con un plan maestro de validación, en el cual indica la política, las metas, intenciones y enfoque de validación que tiene la industria y cuáles serán las estrategias para cumplirlo. El objetivo es proveer un alto grado de seguridad a un proceso, es decir que dicho proceso funcione satisfactoriamente, y generar productos farmacéuticos inocuos y seguros que cumplan con las especificaciones. (GINSBERG S.A. 2014)

Con la meta específica de generar productos de calidad surge la idea de establecer el proyecto de tesis “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DEL PRODUCTO FARMACEUTICO RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS DE LA EMPRESA GINSBERG S.A.”. Su finalidad es obtener un método analítico validado, a través de un protocolo diseñado, basado en los diferentes parámetros de validación como son: precisión, exactitud, repetitividad, reproducibilidad, estabilidad, límites de cuantificación detección y linealidad.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 INFORMACIÓN GENERAL GINSBERG ECUADOR S.A

Ginsberg Ecuador S.A es una industria farmacéutica joven cuyo objetivo es servir a la población ecuatoriana, al generar medicamentos en diferentes formas farmacéuticas con garantía de calidad, inocuidad y seguridad. Su eslogan es “Excelencia En Productos Para Su Salud”, para lo cual cuenta con profesionales que velan por la misión y visión de la industria. **(GINSBERG S.A. 2014)**

La misión de la industria es llegar a ser líderes en la producción de medicamentos accesibles al bolsillo que cumplan con su meta terapéutica y satisfagan al consumidor, en este caso el paciente. Su visión es convertirse en la industria farmacéutica líder del Ecuador.

Ginsberg Ecuador S.A cuenta con la infraestructura necesaria, tiene a disposición dos plantas: una en la ciudad de Quito y la otra ubicada en la ciudad de Guayaquil. Se encuentran organizadas en áreas, cada una con sus respectivas funciones y responsabilidades. **(GINSBERG S.A. 2014)**

1.2 ÁREA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

El área de Aseguramiento de Calidad tiene la responsabilidad de velar por la garantía de calidad y seguridad de cada uno de sus productos, esto lo logra a través de análisis estrictos con la ayuda de métodos automatizados como: Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC), espectrofotometría UV, Infrarrojo. La meta es eliminar riesgos existentes, corrección de errores y dar solución temprana a posibles problemas que pueda presentarse en la cadena de producción hasta el último análisis que se efectúe al medicamento antes de que llegue al paciente. Dicha área es complementada con el área microbiológica y el área de validaciones. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004)**

1.3 ÁREA DE VALIDACIONES

El área de Validaciones es la encargada de documentar que un proceso, equipo, material, método analítico produce resultados veraces otorgando garantía de calidad y seguridad. Para lo mismo cuenta con personal capacitado y equipos 100% calificados.

El área de Validaciones de Ginberg Ecuador S.A cuenta con un Plan Maestro de Validaciones, en el cual constan los lineamientos generales que se deben considerar en el proceso de validación de procesos o métodos analíticos, como en la calificación de áreas y equipos. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014 Instructivo de trabajo Plan Maestro de Validaciones)**

1.3.1 POLÍTICA DEL ÁREA DE VALIDACIONES

La política del área de Validaciones es *“establecer con evidencia documental todos los resultados de su planificación de una manera uniforme con un alto grado de seguridad y contará con el apoyo necesario de todas las áreas para el cumplimiento de su cronograma anual.”* **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014 Instructivo de trabajo Plan Maestro de Validaciones).**

1.3.2 OBJETIVO DEL ÁREA DE VALIDACIONES

El objetivo general radica en identificar la necesidad de establecer estrategias a seguir en el área de validaciones siguiendo los parámetros de calidad exigidos por las zonas reguladoras del Ecuador, cumpliendo de esta forma las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y a través de ello asegurar que sistemas, equipos, procesos, método analíticos produzcan resultados eficientes, seguros, exactos y precisos, evitando posibles errores. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014 Instructivo de trabajo Plan Maestro de Validaciones)**

Como objetivos específicos es elaborar el plan maestro, único documento que describe las actividades a realizarse en un tiempo designado. Este se efectuará de acuerdo a las prioridades y necesidades de la industria. El cual será elaborado por el Jefe de Validaciones. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014 Instructivo de trabajo Plan Maestro de Validaciones)**

La selección de métodos analíticos a ser validados se realizará de acuerdo a la disponibilidad de estándares USP y factibilidad de las técnicas analíticas.

En Ginberg Ecuador, consta de cinco secciones a validar:

- Validación de métodos analíticos
- Validación de procesos de fabricación
- Validación de procesos de limpieza
- Calificación de áreas e instalaciones
- Calificación de equipos.

Por lo dicho, el área de validación en una Industria Farmacéutica ha cobrado un lugar importante en la empresa, pues han palpado los beneficios de contar con un equipo de validación. Dichos beneficios se refieren a la reducción de costos, ya que a través de la validación se detectan errores tempranos en métodos analíticos, en procesos de producción, errores de limpieza, etc. **(VANCE, C. 2013)**

1.4 CONCEPTO DE VALIDACIÓN

Según las Normas de correcta Fabricación edición 99 Validación “es la preparación de una evidencia documental que asegure que un método, proceso, procedimiento, equipos o actividades realizadas genere resultados veraces para lo cual fueron creados”. **(DUFFAU. B, 2010)**

Validación es crear una evidencia documental la cual otorgará una garantía de seguridad y calidad ya sea al método analítico, proceso, sistema de limpieza validado aseverando que los resultados emitidos sean exactos y precisos cumpliendo con los parámetros establecidos. **(DUFFAU. B, 2010)**

1.4.1 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las principales razones que justifican la validación de los métodos analíticos son:

- Demostrar de manera documental que el método analítico es el apropiado para determinado principio activo bajo condiciones prescritos.
- Detectar posibles errores metodológicos y de esta forma evitar errores, reducir costes, creando métodos confiables y seguros.
- Cumplir con exigencias legales emitidas por los organismos reguladores del Ecuador.
- Ayuda a efectuar una transferencia de métodos analíticos. **(DUFFAU. B, 2010)**

1.4.2 REQUISITOS PARA DAR INICIO A UNA VALIDACIÓN

- Tener perfectamente caracterizado el analito.
- Tener suficiente conocimiento del método, efectuar pruebas previas de dicho método.
- Efectuar la validación con una formulación definitiva, si la validación se refiere a una forma farmacéutica. **(DUFFAU. B, 2010)**

1.4.3 MÉTODOS SUSCEPTIBLES DE SER VALIDADOS

Los métodos analíticos no compendiales que no se encuentren referidos en la Farmacopea estarán sujetos a validación. Por otro lado los métodos sujetos a validación se han clasificado de la siguiente manera:

- Ensayos de identificación
- Ensayos para identificación y cuantificación de principios activos de interés.
- Métodos analíticos para determinar propiedades farmacotécnicas de un medicamento.
- Ensayos de limpieza
- Ensayos de producción
- Ensayos microbiológicos. (DUFFAU. B, 2010)

1.4.4 TIPOS DE VALIDACIÓN

1.4.4.1 Validación Retrospectiva.

Este tipo de validación se la conoce como “validación de la historia”, debido a que para su ejecución se usa datos bibliográficos recopilados sobre dicho método a validar, es decir este tipo de validación es apto para métodos no normalizados utilizados tradicionalmente en un laboratorio que cuente con los suficientes datos e información. (GARCÍA. M, 2001)

1.4.4.2 Validación Prospectiva.

Validación utilizada para métodos nuevos o métodos que no disponen de información suficiente, en este tipo de validación se genera datos experimentales a través de los diferentes análisis que se ejecuta para lo cual se desarrolla un protocolo planificado. Generalmente se la practica cuando existen productos nuevos que aún no han sido comercializados. (GARCÍA. M, 2001)

1.4.4.3 Validación Concurrente.

Conocida como revalidación, se usa cuando en alguna parte de la cadena de producción ha sufrido algún cambio, por ejemplo ya sea cambio de proveedor de materias primas, cambio en la formulación del producto farmacéutico. (GARCÍA. M, 2001)

1.4.4.4 Verificación.

Término utilizado para describir el proceso desarrollado cuando se trata de un método que se encuentra normalizado o compendiado en alguna fuente bibliográfica como Farmacopeas vigentes. El objetivo es comprobar que dicho método es utilizado adecuadamente por el laboratorio. (GARCÍA. M, 2001)

1.4.5 CATEGORIAS DE LA VALIDACIÓN

Para proceder a desarrollar una validación es necesario definir si el método a validar es de tipo Cualitativo o Cuantitativo- Analítico- matriz-concentración- principio. Por ello los métodos analíticos para su validación se los ha distribuido en diferentes categorías.

1.4.5.1 Categoría I

Involucra métodos cuantitativos para el análisis de activos ya sea de productos acabados ya sea farmacéuticos, cosméticos o alimenticios. (VELASTEGUI. J, 2011)

1.4.5.2 Categoría II

En esta categoría abarca a métodos destinados a la detección de trazas o impurezas. (VELASTEGUI. J, 2011)

1.4.5.3 Categoría III

Abarca todos los análisis cuantitativos para valuar características de funcionamiento a través de la determinación de un analito de interés, análisis como: perfiles de disolución, liberación del fármaco, etc. (**VELASTEGUI. J, 2011**)

1.4.5.4 Categoría IV

Incluye los análisis para la cuantificación o propiedades físicas de un analito o principio activo presente en una muestra. (**VELASTEGUI. J, 2011**)

1.4.6 PROCESO DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

El proceso de validación a seguir consiste en un plan diseñado a través de pasos que facilitarán la organización y el cumplimiento de toda la evidencia documental que exige un proceso de validación. El mismo que se detalla a continuación en la FIGURA N°1

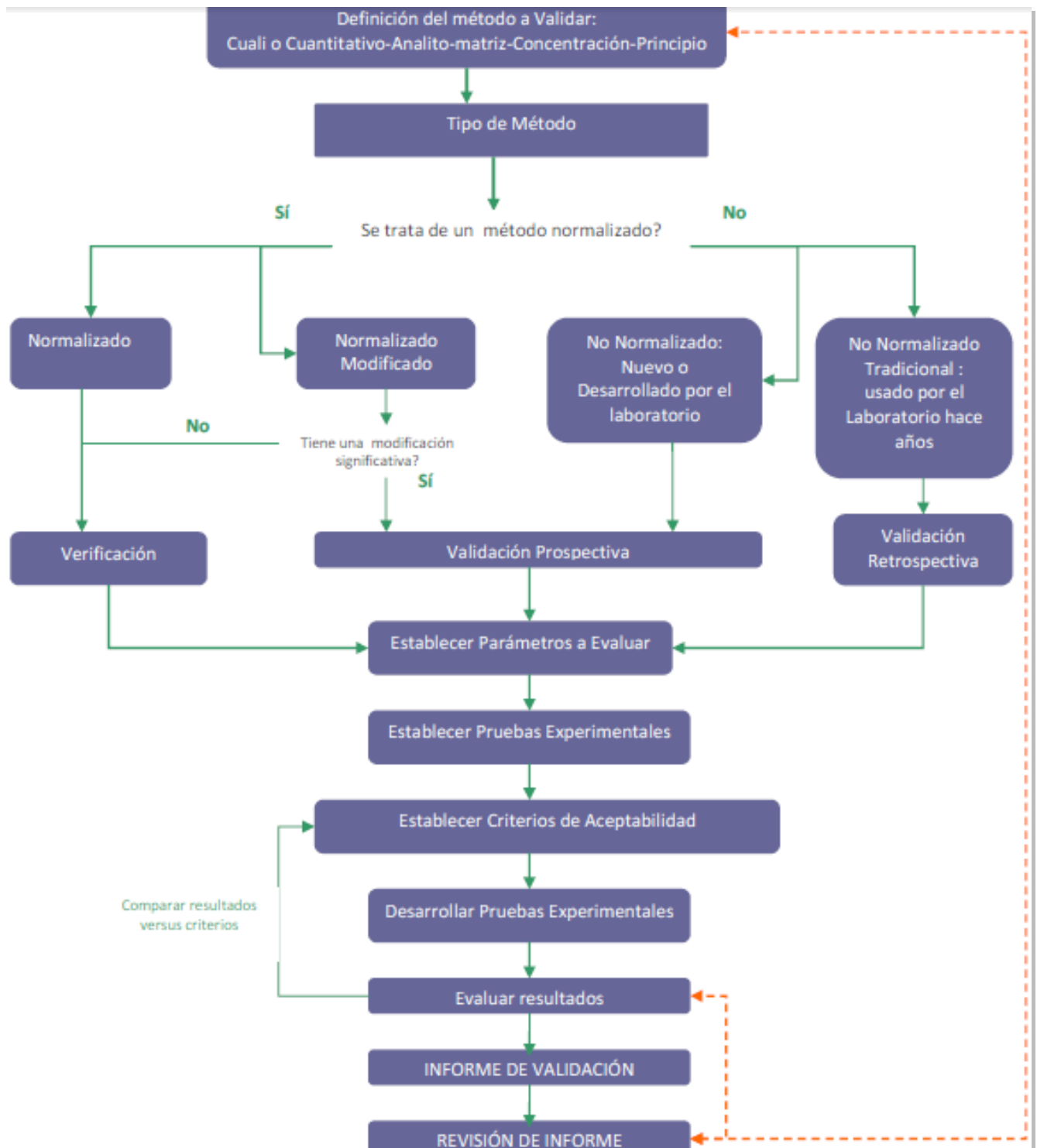


FIGURA N°1. Esquema representativo del proceso de Validación.

Fuente: DUFFAU BORIS, 2010

1.4.7 FASES EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO Y CRITERIOS DE VALIDACIÓN

Al método analítico a validarse se definirá las siguientes características: practicabilidad, idoneidad y fiabilidad. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.1 Características de practicabilidad

Dentro de estas características se encuentra la precisión, sensibilidad, selectividad, condiciones de seguridad tanto del personal como de los equipos utilizados. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.2 Características de idoneidad

En este punto antes de ejecutar el proceso de validación, es recomendable comprobar que el método analítico sea idóneo para el principio activo a validar. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3 Características de fiabilidad

Entre estas características se encuentran los criterios de validación los cuales definirán el grado de seguridad de los resultados de un método analítico. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.1 Selectividad

Conocida como especificidad, es la capacidad del método analítico para determinar, detectar el principio activo en presencia de excipientes, impurezas, sustancias de degradación que conforman la matriz. Para lo cual se valora comparando resultados positivos versus resultados negativos con la ayuda de un placebo. Lo cual ayudará a obtener resultados inequívocos. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.2 Linealidad

Capacidad del método para emitir resultados directamente proporcionales a una determinada concentración dentro de los límites permitidos. Se considera estudiar al menos cinco concentraciones distintas. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.3 Rango

Se refiere al intervalo comprendido entre la concentración mayor o menor, de las cuales ya está determinado su exactitud, precisión y linealidad. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.4 Repetibilidad

Se expresa como el coeficiente variación de varias mediciones. Hace referencia a la precisión del método efectuado dicho análisis bajo idénticas condiciones en lo que respecta a reactivos, equipos, muestra. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.5 Precisión Intermedia

Capacidad de proporcionar resultados próximos entre sí. Se realiza frente a variaciones de analista, equipo y día. Se determina con el cálculo del coeficiente de variación. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.6 Reproducibilidad

Hace referencia a la variabilidad al ser ejecutado por otro analista, equipos u otro laboratorio, cuyos resultados deben ser semejantes. Es decir los resultados deben ser precisos ya que medirá la incertidumbre con respecto a la media. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.7 Exactitud

Es la proximidad o grado de concordancia entre los resultados obtenidos y el valor de referencia. Se recomienda como mínimo 9 determinaciones entre tres niveles de concentración. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.8 Límite de cuantificación

Se define como la mínima concentración que puede ser cuantificada a las mismas condiciones emitidas en la técnica analítica con precisión y exactitud. Este parámetro cobra importancia ya que ayuda a cuantificar concentraciones pequeñas de principio activo en un medicamento. Conocido también como límite cuantitativo. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.9 Límite de detección

Mínima concentración que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, pero con cierto grado de exactitud y precisión. Conocido también como límite cualitativo. (ORTEGA. L, 2011)

1.4.7.3.10 Robustez

Capacidad del método analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas como: pH, temperatura, flujo, composición de la fase móvil. (ORTEGA. L, 2011)

TABLA 1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN A ANALIZAR SEGÚN EL TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO A VALIDAR.

Fuente: DUFFAU, Boris, 2010

PARÁMETRO		MÉTODO CUANTITATIVO			
PARA EVALUAR	CARACTERÍSTICAS	MÉTODO CUALITATIVO	NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito o interferencias de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LÍMITES	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISIÓN	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	Sí	Sí	Sí	Sí

1.4.8 DOCUMENTACIÓN EN EL ÁREA DE VALIDACIONES

La documentación a efectuarse en el área de validación son:

1.4.8.1 Protocolo de Validación

En este documento se indicará las pruebas, metodologías y puntos críticos necesarios a seguir para la validación. Será elaborado por el analista de validaciones, revisado por el Jefe de validaciones y por la dirección técnica. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004)**

1.4.8.2 Informe de Validación

Documento elaborado por el analista del área, en el cual se incluirá un resumen de todo el proceso de validación. Constarán los resultados con su respectivo análisis estadístico. De ser oportuno se podrá anexar recomendaciones, observaciones. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004).**

En caso de existir desviaciones significativas o no conformidades, se analizará el impacto sobre la calidad del producto farmacéutico validado. Esto debe ser anexado en el reporte de validación en caso de ser necesario el sistema deberá ser revalidado. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004)**

1.4.8.3 Certificado de Validación

Es un documento formal de aprobación firmado por el jefe de validaciones y la dirección técnica. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004)**

1.4.8.4 Status de Validación

Documento en el cual consta el cumplimiento del plan maestro. Se incluirá los productos que requieran validación de métodos así como los procesos de fabricación, de limpieza. **(GINSBERG ECUADOR S.A, 2014. Instructivo AC-05-004)**

1.5 CROMATOGRAFÍA

1.5.1 INTRODUCCIÓN

En el año de 1906 Tswett, logró por primera vez aislar pigmentos coloreados de plantas a través de una columna de alúmina. Fueron muchos los hechos que surgieron a partir de esta experiencia como los que se cita a continuación:

- En el año de 1952 se impulsó al desarrollo de la Cromatografía de Gases gracias a la colaboración de Martin y James, pero el limitante del tipo de muestras a analizar a través de esta técnica impulsó a considerar de nuevo la Cromatografía Líquida esto ocurrió en la década de los sesenta. **(BERNAL. B, 2010)**
- En la década de los sesenta se propone mejorar la CL (Cromatografía Líquida) con el uso de fases estacionarias con diámetro de partículas menores a 3-25 μm , que eran las que se disponían antiguamente.
- La experiencia adquirida en el desarrollo de la CG (Cromatografía de Gases) fue de gran utilidad para mejorar y crear la Cromatografía Líquida de Alta eficiencia a través de sistemas nuevos de inyección, circulación del eluyente y detección. **(BERNAL. B, 2010)**

1.5.2 CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA

Para clasificarla es necesario tomar en cuenta el tipo de fase estacionaria y fase móvil que se utilice, la polaridad y la interacción de los componentes con la fase estacionaria, de acuerdo a estos puntos se ha clasificado como se describe a continuación:

1.5.2.1 Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un adsorbente, es decir un sólido, la más utilizada es la sílica gel. La cual atraerá al solvente como al soluto a sus puntos más polares. La separación se dará por continuas etapas de adsorción: desorción. **(BERNAL. B, 2010)**

1.5.2.2 Cromatografía de reparto/adsorción

La separación se da por el reparto o parición del soluto en la fase móvil y estacionaria. **(BERNAL. B, 2010)**

1.5.2.3 Cromatografía de intercambio iónico

Se presenta cuando la fase estacionaria contiene en su superficie iones conocidos de característica selectiva, en los cuales se quedan retenidos iones de carga opuesta que se encuentran en la fase móvil. **(BERNAL. B, 2010)**

1.5.2.4 Cromatografía de exclusión molecular

Este tipo de cromatografía se caracteriza por poseer poros de tamaño selectivo, los cuales se encargan de la separación de moléculas que no están dentro del rango del tamaño del poro. **(URIBE, R. 2013)**

Haciendo referencia a la polaridad de la fase estacionaria existen los siguientes tipos de cromatografía:

1.5.2.5 Cromatografía de Fase Normal

Se destaca por la polaridad de la fase estacionaria. Las interacciones con el soluto son específicas al principio activo a estudiar. (URIBE, R. 2013)

1.5.2.6 Cromatografía de Fase Inversa

La fase estacionaria tiene un comportamiento apolar. (URIBE, R. 2013)

De acuerdo a la fase estacionaria y fase móvil que se utilice tenemos los siguientes tipos de cromatografía:

TABLA Nº 2. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

TIPO DE CROMATOGRAFÍA	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL
SÓLIDO-LÍQUIDO	Sólido	Líquido
LIQUIDO-LIQUIDO	Líquido anclada en un soporte sólido	Líquido
LÍQUIDO-GAS	Líquido no volátil	Gas
SÓLIDO-GAS	Sólido	Gas

FUENTE: BERNAL CASTAÑEDA, Bianca, et al. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. México: Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Métodos cuantitativos. 2010. 14 p

1.5.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Este tipo de cromatografía tiene como fase estacionaria un sólido o un líquido inmiscible y como fase móvil un líquido. El fundamento se caracteriza por la afinidad

de los diferentes analitos, se separarán de acuerdo al tiempo de elución y velocidad propia de cada analito. (URIBE, R. 2013)

1.5.3.1 Parámetros del HPLC

1.5.3.1.1 Diámetro interno de la columna

Es un parámetro de gran relevancia y que de este dependerá la sensibilidad de la columna a usarse. También influye en la cantidad de muestra que puede introducirse en dicha columna.

Existen dos tipos de diámetro, el mayor a 10 mm el cual se usa para purificación, en cambio el menor a 5 mm utilizado para cuantificación de muestras. (GISMERA, M. 2009)

1.5.3.1.2 Medida de partículas

La más usada es de 5 μm de diámetro, mientras menos sea el diámetro mejor separación existirá. (GISMERA, M. 2009)

1.5.3.1.3 Tamaño del poro

Los poros de mayor tamaño ofrecen mayor cinética en cambio los de menor tamaño proporcionan mayor superficie. (GISMERA, M. 2009)

1.5.3.1.4 Presión del sistema

Tiene relación con el tamaño de las partículas ya que a un menor tamaño mayor presión y viceversa. Pero en ambos casos debe otorgar un flujo reproducible y constante. (GISMERA, M. 2009)

1.5.3.2 Equipo para cromatografía de alta eficiencia

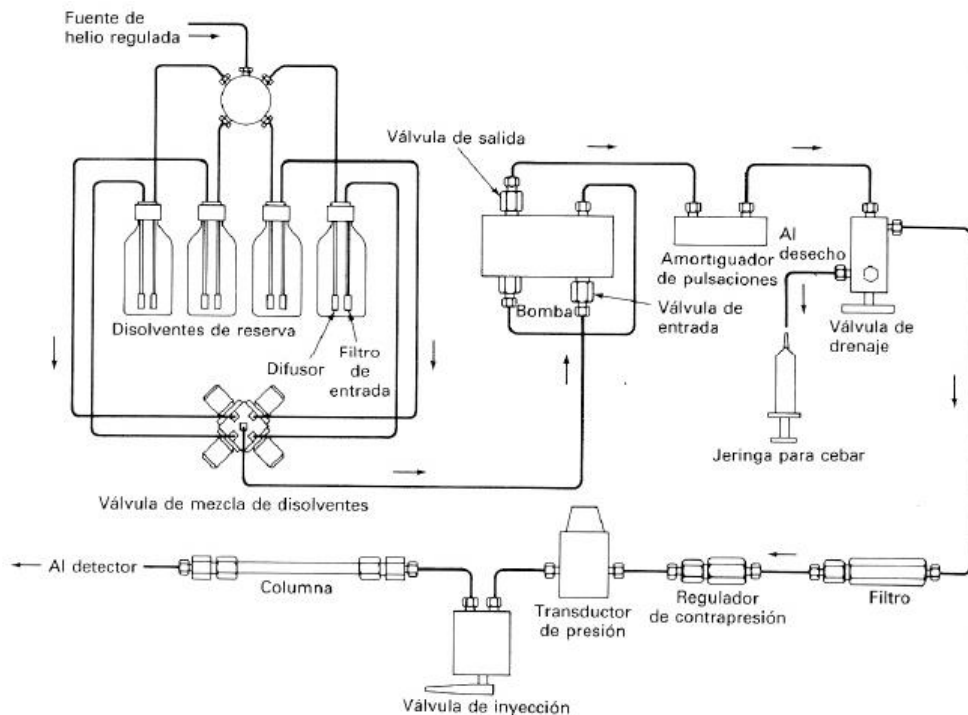
Debido al avance adquirido en este tipo de cromatografía es necesario el anexo de ciertos dispositivos a un cromatógrafo normal ya que se dispone de partículas de diámetro pequeño en la fase estacionaria. (**GISMERA, M. 2009**)

- Bomba y mezclado de eluyentes
- Dispositivos de inyección.
- Conducciones y conexiones
- Detector y Registrador
- Columna. (**GISMERA, M. 2009**)

Con el propósito de mejorar el funcionamiento se puede anexas los siguientes dispositivos:

- Inyectores automáticos
- Hornos termostatzados para columnas
- Colectores de fracciones
- Sistema de tratamiento de datos. (**GISMERA, M. 2009**)

GRÁFICO N°1. ESQUEMA DEL HPLC (EQUIPO PARA CROMATOGRAFÍA DE ALTA EFICIENCIA)



FUENTE: BERNAL CASTAÑEDA, et al. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. México: Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotechnología Métodos cuantitativos. 2010.

14 p.

1.5.3.2.1 Dispositivos para la fase móvil

Se utiliza recipientes de vidrio que contiene tubos de teflón con aditamentos diseñados para eliminar gases y partículas. (VELASTEGUI. J, 2011)

1.5.3.2.2 Bomba

La función de la bomba es suministrar un caudal suficiente de la fase móvil. Para lo cual es necesario un sistema de bombas para regular la velocidad y flujo de la fase móvil. Debe cumplir con las siguientes características:

- Que pueda trabajar a presiones elevadas superiores a 6000 psi

- Libre de pulsaciones ya que de existirlas afecta a la sensibilidad al aumentar el ruido en el fondo del detector.
- Que el material que conforma el sistema de bombas sea inerte.
- Abastecer flujos adecuados para una determinada columna.
- El caudal debe ser constante ya que de este dependerá la reproducibilidad de los tiempos de retención.
- Existen tres tipos de bombas: reciprocas, neumáticas y desplazamiento.
(VELASTEGUÍ. J, 2011)

1.5.3.2.3 Sistema de Inyección

Son válvulas dosificadoras encargadas de inyectar una determinada cantidad de muestras el rango es de 5-500 μL . Debe ser de fácil manejo e inyectar la muestra a la columna con una banda estrecha. (VELASTEGUÍ. J, 2011)

1.5.3.2.4 Conducciones y Conexiones

Son de gran importancia ya que de las mismas dependerá la eficacia del sistema. El tubo de conducción se considera un volumen muerto, mientras menor sea el mismo habrá mayor eficacia, por lo cual se usa tubos capilares de diámetro pequeño.

Existen dos tipos de conexión las uniones y reducciones. Las uniones unen tubos del mismo diámetro, en cambio las reducciones modifican el diámetro de la conducción. En ambos parámetros es de vital importancia controlar el volumen muerto.
(VELASTEGUÍ. J, 2011)

1.5.3.2.5 Detector

Dispositivo que emite una respuesta a una propiedad del eluyente o fase móvil. Las características deseadas son:

- Emitir una respuesta inmediata y selectiva
- Sensibilidad, estabilidad y reproducibilidad adecuada
- Manejo sencillo

Los tipos de detectores más conocidos son: uv-visible, fluorescencia, absorbancia, refracción, electroquímico, dispersión de luz y por espectroscopia de masas. (**URIBE, R. 2013**)

Con la finalidad de ampliar los límites de detección de impurezas en concentraciones mínimas, el uso de un detector UV-visible es la mejor opción para anexarlo al cromatógrafo. (**URIBE, R. 2013**)

1.5.3.2.5.1 Detector UV-visible

Es el detector de absorbancia que posee doble longitud de onda, lo que le aporta características de ser más sensible a la hora de efectuar análisis en el equipo HPLC. Además de que este tipo de detectores son económicos, por lo cual es utilizado por la farmacéutica y ciencias biomédica. Como principal desventaja tenemos que este tipo de detector no puede absorber luz en rangos bajos. (**DENMAR, D. 2013**)

Las características que destacan a este tipo de detector son:

- Otorga un funcionamiento óptimo con el más mínimo ruido.
- Posee una sensibilidad mejorada.
- Por el uso de la lámpara de deuterio, le otorga una relación señal/ ruido mejorada.
- Posee un control en la variación térmica al disminuir la deriva de la línea base, en caso de producirse por cambios ambientales. (**DENMAR, D. 2013**)

1.5.3.2.6 Columna

Es el dispositivo de acero inoxidable en donde tiene lugar la separación de los analitos, las más utilizadas son las de relleno, que contienen partículas de la fase estacionaria, las características que influirán en el éxito de la separación son: diámetro interno, conexiones, relleno, longitud, tamaño de partículas de relleno. (URIBE, R. 2013)

1.5.3.2.6.1 Columnas Atlantis

Estos dispositivos surgen por la necesidad de lograr separaciones eficaces, ya que existen compuestos difíciles de analizar, que debido a la composición química de la columna no puede ser retenidos o coeluyen al principio del cromatograma. (CUEVA, A. 2004)

- Las **Atlantis™ dC18** son un tipo de columnas de base de sílice con cadenas acopladas C18 difuncionales. Lo cual servirá para analizar sustancias hidrolíticas o hidrófobas en cromatografía de fase reversa. Además este tipo de columna tiene alta compatibilidad con columnas LC/MS generando una buena reproducibilidad. (CUEVA, A. 2004)

1.5.3.3 Elección de la Columna y Fase Móvil

La elección dependerá de los analitos a separar su naturaleza química. Como primer punto se deberá seleccionar el sistema cromatográfico a usar de acuerdo a la clasificación cromatográfica descrita anteriormente (ver punto 1.5.2.) la elección de la columna dependerá de la solubilidad del principio activo ya sea en solvente orgánico o inorgánico. (BERNAL. B, 2010)

La selección de la fase móvil es el parámetro fácilmente variable, el cual se modificará hasta lograr una buena separación. La elección de la fase móvil se efectúa con la ayuda de la escala de Hildebrand en donde se muestra diferentes eluyentes con su respectiva fuerza eluotrópica tomando como referencia el pentano. (URIBE, R. 2013)

TABLA N°3. LISTAS DE ELUYENTES MÁS UTILIZADOS

DISOLVENTE	INDICE DE REFRACCIÓN	VISCOCIDAD Cp^b	PUNTO DE EBULLICIÓN °C	ÍNDICE DE POLARIDAD P	FUERZA DEL ELUYENTE ε°
Fluoralcenos	1.27-1.29	0.4-2.6	50-174	< -2	-0.25
Ciclohexano	1.423	0.90	81	0.04	-0.2
n-hexano	1.372	0.30	69	0.1	0.01
1-Clorobutano	1.400	0.42	78	1.0	0.26
Tetracloruro de carbono	1.457	0.90	77	1.6	0.18
Propiléter	1.365	0.38	68	2.4	0.28
Tolueno	1.494	0.55	110	2.4	0.29
Dietiléter	1.350	0.24	35	2.8	0.38
Tetrahidrofurano	1.405	0.46	66	4.0	0.57
Cloroformo	1.443	0.53	61	4.1	0.40
Etanol	1.359	1.08	78	4.3	0.88
Acetato de etilo	1.370	0.43	77	4.4	0.58
Dioxano	1.420	1.2	101	4.8	0.56
Metanol	1.326	0.54	65	5.1	0.95
Acetonitrilo	1.341	0.34	82	5.8	0.65
Nitrometano	1.380	0.61	101	6.0	0.64
Etilenglicol	1.431	16.5	182	6.9	1.11
Agua	1.333	0.89	100	10.2	Grande

FUENTE: BERNAL CASTAÑEDA, Bianca, et al. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. México: Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Métodos cuantitativos. 2010. 14 p.

1.6 VITAMINAS

1.6.1 INTRODUCCIÓN

En el año de 1973 tras la presencia del escorbuto (deficiencia de vitamina C) se evidenció la importancia del consumo de vitaminas. El doctor escocés James Lind enunció que esta enfermedad era prevenible si se consumía diariamente una porción de fruta fresca. Por otro lado, la enfermedad de los nervios periféricos como el beri beri producida por la deficiencia de tiamina fueron trascendentales para que a inicios del siglo XX el químico polaco Casimir Funk elabore un concentrado de levadura para tratar esta patología. **(ENTRALA. A, 2007)**

Estos hechos ha impulsado que las Industrias Farmacéuticas creen nuevas formas farmacéuticas como: comprimidos, jaleas, jarabes conocidos como multivitaminicos, que son complejos que contienen las vitaminas requeridas diarias por el organismo para su correcto funcionamiento. **(SÁNCHEZ. A, 2008)**

1.6.2 CONCEPTO DE VITAMINAS

Son compuestos orgánicos que participan en procesos bioquímicos del organismo, al no ser posibles sintetizarlas es necesario consumirlas a través de la dieta diaria.

Las funciones que cumplen las vitaminas en el organismo son:

- Reparación de tejidos lisados
- Interviene en el metabolismo
- Ayuda al correcto funcionamiento del sistema inmunitario.
- Ayuda a prevenir posibles enfermedades como: anemia, patologías cardíacas, cáncer, artritis, alzheimer. **(BROWN, L. CHALLEM, J. 2007)**

1.6.3 CLASIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS

Existen 13 tipos de vitaminas clasificadas en dos grupos de acuerdo a la solubilidad que presentan existiendo vitaminas liposolubles e hidrosolubles. (MATAIX, J. SÁNCHEZ, F. 2009)

1.6.3.1 Vitaminas Hidrosolubles

Este tipo de vitaminas presentan gran solubilidad en agua, su almacenamiento en el organismo es limitado ya que son fácilmente excretadas en la orina. Su principal función es actuar como cofactores enzimáticos. (CASTILLO. F, 1991)

Dentro del grupo de vitaminas hidrosolubles se encuentra:

➤ Vitaminas de transporte electrónico (Oxidoreducción)

- Vitamina C (Ácido Ascórbico)
- Niacina
- Vitamina B2 (Riboflavina). (SÁNCHEZ. A, 2008)

➤ Vitaminas de transporte de grupo

- Cobalamina: transporta grupos metilos.
- Ácido Fólico: transporta fragmentos monocarbonados.
- Vitamina B1 (Tiamina): el grupo transportado es el aldehído activo
- Vitamina B6 (Piridoxina): el grupo amino es el transportado
- Vitamina B5 (Ácido Pantoténico): el grupo acilo es el transportado.
- Vitamina B8 (Biotina): el grupo carboxilo es el transportado. (SÁNCHEZ. A, 2008)

1.6.3.2 Vitaminas Liposolubles

A este grupo de vitaminas se las ha agrupado debido a su insolubilidad en agua y por su afinidad a un medio lipídico, por lo cual son fácilmente almacenadas en el organismo. Actúan como receptores específicos del tejido blanco. (**SOUCCAR. T**, 2001)

Dentro de este grupo se encuentra las siguientes vitaminas:

- Vitamina A (Retinol)
- Vitamina D2 (Ergocalciferol)
- Vitamina D3 (Colecalciferol)
- Vitamina E (Tocoferol)

Vitamina K (Fitomenadiona). (**SOUCCAR. T**, 2001)

1.6.4 RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS

1.6.4.1 Datos Generales del Producto

Este tipo de forma farmacéutica son preparaciones sólidas resultado de una compresión a un determinado volumen. Su administración es vía oral. (**VERGES, E.** 2011)

Existen varios tipos de comprimidos de acuerdo a los excipientes que utilicen para su fabricación ya sea disgregantes, diluyentes, aglutinantes o alguna sustancia que influya en el comportamiento farmacodinámico y farmacocinético del principio activo. (**SOUCCAR. T**, 2001)

Clasificándole a los comprimidos de la siguiente manera:

- Comprimidos recubiertos, no recubiertos
- Comprimidos efervescentes
- Comprimidos de liberación retardada
- Comprimidos gastrorresistentes
- Comprimidos destinados. (**CASTILLO. F**, 1991)

Los comprimidos de Retinol son no recubiertos, es decir no presentan una cubierta de resinas naturales o sintéticas. Son de aspecto uniforme son resultado de una compresión única. Este tipo de comprimidos contiene como principio activo la Vitamina A (Retinol) cuyas funciones son de gran importancia en el organismo. (CASTILLO. F, 1991)

1.6.4.2 Composición y Especificaciones de los comprimidos RETINOL 50000 UI

Cada comprimido contiene: Retinol (Vitamina A acetato) equivalente a 50000 UI de Vitamina A, excipientes c.s.

TABLA N°4. ESPECIFICACIONES DE LOS COMPRIMIDOS DE RETINOL 50000 UI

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES
ASPECTO	Comprimidos redondos biconvexos de color blanco con un bisectado en una de sus caras.
PESO PROMEDIO	90,0 mg - 110,0 mg
DIAMETRO	7,0 mm \pm 1 mm
ESPESOR	2,9 mm \pm 1 mm
DUREZA	Mayor a 4,0 kp
DESINTEGRACION	Menor a 30 minutos
PERDIDA POR SECADO	Máximo 8,0%
DISOLUCION	No menos que 70% (Q)
ASSAY RETINOL	45.000 UI - 60.000 UI/ comprimido
UNIFORMIDAD DE DOSIS	El contenido de no más de un comprimido está fuera del límite de 85% a 115% y ninguno se encuentra fuera del límite de 75% a 125% respecto de lo declarado. Y se mantiene dentro de la especificación de tener una desviación estándar relativa $\leq 6\%$

FUENTE: METODOLOGÍA INTERNA GINSBERG ECUADOR S.A

1.6.4.3 Vía de Administración

Administración exclusiva por vía oral. (CAPITAN. H, 2010)

1.6.4.4 Almacenamiento

Se recomienda almacenarlo a temperatura que no sobrepase los 25°C, protegerlo de la luz. (CAPITAN. H, 2010)

1.6.4.5 Elaborado por

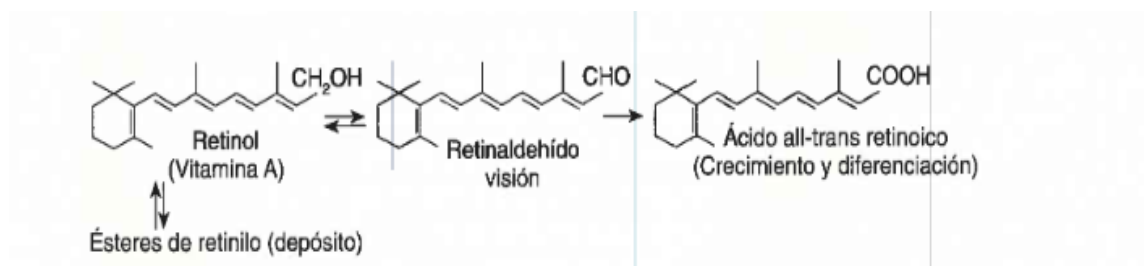
Laboratorio GINSBERG ECUADOR S.A Quito-Ecuador.

1.6.4.6 Descripción del principio activo Vitamina A acetato

Vitamina liposoluble conocida también como retinol, nombre dado por Drummond en 1920. La vitamina A fue aislada por Morton en 1937 cuyo objetivo fue estudiar la actividad biológica de la misma. (HERILLA, E. 2010).

La estructura de la vitamina A es un derivado de la beta ionona, de baja estabilidad ya que es muy sensible al oxígeno, luz, por lo cual es necesario tener precauciones en su almacenamiento. La vitamina A de forma comercial se encuentra de dos tipos: vitamina A acetato o palmitato, son de aspecto oleoso o polvo estabilizado. (HERILLA, E. 2010).

GRÁFICO N°2. ESTRUCTURA DEL RETINOL (VITAMINA A)



FUENTE: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Hernande%20Rodriguez/vitaminas.pdf

1.6.4.7 Mecanismo de Acción

Dentro de las principales funciones de la vitamina A se encuentran:

- Interviene en la visión ya que la forma activa retinaldehído tiene relación directa con la dopsina proteína involucrada en la visión.
- Ayuda al crecimiento
- Actúa en la diferenciación de células epiteliales al originar una correcta producción de moco, ya que la deficiencia origina un fallo en la queratinización del epitelio de la córnea, intestinos, pulmón y piel.
- En la reproducción: ya que es necesario para la espermatogénesis
- Por su actividad antioxidante previene el cáncer. (SOUCCAR. T, 2001)

La deficiencia de vitamina A puede ocasionar ceguera parcial o total, alteraciones del equilibrio, produce infertilidad. Por todo ello, es recomendable consumirla la dosis recomendada de acuerdo a la edad del individuo, para un adulto la dosis es de 3000 UI

Las fuentes principales de vitamina A son: la yema de huevo, hígado de bacalao, zanahoria, espinaca, etc. (SOUCCAR. T, 2001)

1.6.4.8 Farmacocinética

La Vitamina A acetato es fácilmente absorbible por vía oral, pero su absorción completa se da a nivel gastrointestinal, al convertirse en retinol, por la intervención de enzimas pancreáticas, que hidrolizan a los ésteres presentes en la molécula de dicha vitamina. (CALVO. D, 2005)

Posteriormente se almacena a nivel hepático, de acuerdo a las necesidades del organismo es liberada a través de proteínas específicas, el exceso de retinol es eliminado en forma de ácido retinoico y otros metabolitos a través de las heces y orina. (CALVO. D, 2005)

1.6.4.9 Indicaciones y Posología

La dosis recomendada para adultos es de 50000-100000 UI/día y para niños la mitad de la dosis normal. (CAPITAN, H. 2010)

En cuanto a indicaciones terapéuticas, la vitamina A acetato es usada en caso de que el paciente tenga dificultades en la cicatrización, además está indicada como tratamiento de patologías ocasionadas por su déficit como: xerosis de córnea (daño en el epitelio conjuntivo), hemeralopía (dificultades de visión en horas del día). (CAPITAN. H, 2010)

1.6.4.10 Contraindicaciones

La ingesta de Vitamina A en dosis elevadas puede ocasionar una hipervitaminosis, que puede conducir a un daño hepático o renal, no obstante, a pesar que la vitamina A se absorbe con rapidez, es una vitamina liposoluble que se elimina de manera lenta del organismo. (ENGEL, P. 2012)

1.6.4.11 Interacciones

Se ha registrado interacciones con: antiácidos con hidróxido de aluminio, anticonceptivos orales, neomicina oral, anticoagulantes derivados de la cumarina. (CAPITAN. H, 2010)

1.6.4.12 Reacciones Adversas

Existe presencia de reacciones adversas cuando se excede de la dosis normal de Vitamina A, de ser el caso, se presenta: irritabilidad, fatiga, pérdida del apetito, mialgias, mareos, inflamación de nódulos linfáticos. (PENNISTON. K, TANUMIHARDJO. S, 2006)

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se puntualiza el programa experimental a desarrollarse con el objeto de ejecutar el procedimiento de validación del método analítico para valoración de vitamina A acetato por cromatografía líquida de alta eficiencia del producto farmacéutico RETINOL comprimidos.

Los temas a describirse son:

- Diseño experimental
- Protocolo
- Técnicas desarrolladas para la validación del método analítico.

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

LUGAR: Industria Farmacéutica GINSBERG ECUADOR S.A

CANTÓN: Quito

PROVINCIA: Pichincha

2.1.2 FACTORES DE ESTUDIO

POBLACIÓN

El grupo poblacional para el desarrollo del estudio será el retinol 50000 UI comprimidos de tres lotes diferentes producidos en la planta farmacéutica Ginsberg Ecuador S.A

MUESTRA

Las muestras corresponden a los comprimidos de Retinol 50000 UI Excipientes c.s. Por tratarse de un producto nuevo elaborado por GINSBERG ECUADOR S.A, se toma tres lotes pilotos elaborados con el propósito de validar el método analítico para la determinación y cuantificación del principio activo.

2.1.3 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

2.1.3.1 Lugar y Pruebas de Ensayo

El siguiente perfil de investigación se efectuó en el Laboratorio Físico-Químico del área de Control de Calidad conjuntamente con el departamento de Validaciones de la Empresa GINSBERG ECUADOR S.A ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito.

Las pruebas a realizarse son:

- Se analizó los parámetros de validación según el tipo de método analítico a tratarse como son: linealidad, precisión, exactitud, rango, especificidad, estabilidad, límites de detección y cuantificación.
- De los resultados obtenidos se efectuó un análisis estadístico.

2.2 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA VALORACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS COMPRIMIDOS DE RETINOL

2.2.1 TITULO: PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS

2.2.1.1 Generalidades

Esta documentación describe el método analítico, responsabilidades y criterios de aceptación de la Validación del Método de Análisis para la cuantificación de Vitamina A acetato por Cromatografía Líquida HPLC, en Retinol 50.000 UI Comprimidos.

2.2.1.2 Objetivo

Demostrar que el método analítico desarrollado por Ginsberg Ecuador S.A. utilizado para la valoración de Vitamina A acetato por Cromatografía Líquida HPLC, en Retinol 50.000 UI Comprimidos, cumple con los requerimientos para el que fue diseñado, y por lo tanto es capaz de proveer resultados reproducibles y confiables.

2.2.1.3 Alcance

Desarrollar el método cromatográfico para la cuantificación de Vitamina A acetato por Cromatografía Líquida HPLC, en Retinol 50.000 UI Comprimidos.

2.2.1.4 Responsabilidades

ROL	RESPONSABILIDADES
Analista de Validaciones	Elaborar el protocolo / informe de validación, en base a este se realiza el análisis de validación.
Jefe de Validaciones	Revisa el protocolo y el informe de validación. Emite el certificado de validación conjuntamente con la Dirección técnica.
Dirección Técnica	Aprueba los protocolos e informes de validaciones. Emite conjuntamente con el Jefe de validaciones el certificado de validación.

FUENTE: METODOLOGÍA INTERNA GINSBERG ECUADOR S.A

2.2.1.5 Método de Análisis

El método analítico para valorar Vitamina A acetato, en Retinol 50.000 UI Comprimidos no se encuentra compendiado, por tanto el método a validar se basa en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) usando como disolvente Agua a 50 °C; Etanol y como fase móvil Acetonitrilo: Metanol (50:50), la longitud de onda determinada según bibliografía para dicho análisis es de 326 nm.

2.2.1.6 Fundamento

La metodología desarrollada por Ginsberg Ecuador S.A. para validación de Vitamina A en Retinol 50000 UI comprimidos se basa en el uso de: disolvente y fase móvil; las mismas que ayudarán a la extracción, con ayuda del ultrasonido por un lapso de 10 minutos. Las muestras serán procesadas y analizadas según el Anexo I.

La cuantificación se desarrollará en el equipo HPLC, bajo condiciones operacionales establecidas con anterioridad, posteriormente se comparará las áreas obtenidas, con las

de estándares conocidos. Determinando las concentraciones presentes en cada una de las muestras. Permittiéndonos valorar si dichos resultados, se encuentran dentro de los rangos permitidos.

2.2.1.7 Equipos y Reactivos

- Cromatógrafo WATERS HPLC
- Balones aforados ámbar de 50 ml
- Pipetas volumétrica de 2 ml
- Probeta de 25 ml
- Ultrasonido FISHER SCIENTIFIC FS30H
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Etanol p.a
- Agua
- Estándar Vitamina A acetato
- Jeringas
- Filtros 0,45 µm

2.2.1.8 Especificación Requerida

VITAMINA A acetato : 50.000 UI/COMPRIMIDO

45.000 – 60.000 UI VITAMINA A /
COMPRIMIDO

90,0 – 120,0 %

2.2.1.9 Condiciones de Operación

Equipo:	Cromatógrafo WATERS HPLC
Columna:	Atlantis ®Dc 18 5µm 4.6x150mm
Longitud de onda:	326 nm
Flujo:	1.2 mL / min
Fase móvil:	Acetonitrilo : Metanol (50:50)
Volumen de inyección:	20 µL
Tiempo de corrida:	10 minutos
Disolvente:	Agua a 50°C; Etanol (15:85)
Temperatura del horno de columna:	30°C

2.2.1.10 Preparación del estándar

- Como primer punto, se verificó que la balanza OHUS se encuentre calibrada, por lo cual se revisó la bitácora de dicho equipo. Posteriormente se pesó por duplicado con exactitud 25,0 mg de estándar de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50,0 ml, se agregó 15,0 ml de agua a 50°C, se procedió a agitar y se adicionó 10 ml de etanol. Con el objeto de obtener una completa disolución se ultrasonó las muestras por un lapso de 10 minutos, culminado este proceso, se llevó aforo con etanol.
- En un balón de 50,0 ml, se colocó una alícuota de 2 ml de la solución obtenida del paso previo, se aforó a volumen con etanol, mezclar bien.
- Finalmente se filtró la última disolución por filtro de 0,45µm y se inyectó 20µL en el cromatógrafo HPLC

$$C_{st}(\text{VITAMINA A ACETATO}) = [0,020 \text{ mg/ml}]$$

2.2.1.11 Preparación de la muestra

- En un mortero se trituró 10 tabletas.
- Se pesó por duplicado y con mayor exactitud el equivalente a 25 mg de Vitamina A, aproximadamente 145,35 mg de polvo de acuerdo al peso promedio, en un balón aforado de 50,0 ml.
- Se añadió 15 ml de agua a 50 °C se procedió a agitación manual, para posteriormente colocar 10 ml de etanol, se ultrasonó las muestras hasta completa disolución.
- Enfriar y aforar con etanol.
- Tomar una alícuota de 2,0 ml en un balón aforado de 50,0 ml aforar con etanol y mezclar bien, es decir homogenizar.
- En último lugar se filtró la última disolución por filtro de 0,45µm y se inyectó 20µL en el cromatógrafo HPLC.

$$C_m (\text{VITAMINA A ACETATO}) = [0,020 \text{ mg/ml}]$$

2.2.1.12 Cálculos

$$\text{mg (VITAMINA A ACETATO / COMPRIMIDO)} = \frac{A_m \times C_{St} \times PP}{A_{St} \times C_m}$$

Dónde:

A_m	=	Área de la muestra
A_{St}	=	Área del estándar
C_m	=	Concentración Muestra
C_{St}	=	Concentración estándar
PP	=	Peso promedio

$$\% \text{ (VITAMINA A ACETATO/ COMPRIMIDO)} = \text{mg (VITAMINA A ACETATO)} \times \frac{100}{17,2}$$

$$\text{UI de Vitamina A: mg Vitamina A acetato} \times \frac{2906.98 \text{ UI Vitamina A}}{1 \text{ mg Vitamina A acetato}}$$

$$\% \text{ de Vitamina A: UI Vitamina A} \times \frac{100}{50.000}$$

2.2.1.13 Parámetros de Validación

- Linealidad
- Rango
- Exactitud
- Precisión
- Reproducibilidad
- Estabilidad de las soluciones analíticas
- Especificidad en relación con el placebo

2.2.1.14 Proceso de Validación

Con la finalidad de llevar a cabo dicho proceso de validación, se usó como referencia el protocolo desarrollado y aceptado por la dirección técnica de la industria farmacéutica Ginsberg. En el proceso se debe garantizar que los parámetros a analizar cumplan con los criterios de aceptación en cuanto a linealidad, rango, exactitud, precisión, especificidad del método, límite de detección y cuantificación. En el anexo se adjunta el método de análisis de Vitamina A acetato. (Anexo I)

2.2.1.15 Criterios de Validación

2.2.1.15.1 Linealidad

Se realiza la estandarización de la curva de calibración, definiendo un rango de trabajo, el cual ya se encuentra establecido por la empresa farmacéutica GINSBERG ECUADOR S.A. Para desarrollar la regresión lineal se preparará cinco soluciones de concentraciones del: 60%, 100 % y 140 % y tres soluciones del 80 y 120%. Cuyo coeficiente de correlación (r) Mín aceptable 0.999.

Con respecto al coeficiente de variación no debe ser mayor a al 2,0%

2.2.1.15.2 Rango de trabajo

El rango de trabajo se encuentra determinado por cinco soluciones al 60 % y 140% con adición de placebo. Cuyo porcentaje de recuperación debe encontrarse entre 95.0 – 105.0 %, con un coeficiente de variación: Máx. 2.0 %

2.2.1.15.3 Exactitud

Se llevará a cabo este parámetro con el análisis de seis soluciones al 100 % con adición de placebo. Porcentaje de recuperación: 95.0 – 105.0 %, coeficiente de variación: Máx. 2.0 %

Se complementará dicho análisis con tres soluciones al 80, 100 y 120 % con adición de placebo, cuyo porcentaje de recuperación será 95.0 – 105.0 %, con un coeficiente de variación: Máx. 2.0 %

2.2.1.15.4 Precisión

- Repetibilidad

La repetibilidad se analizará seis soluciones muestra de un solo lote, el porcentaje de recuperación que se deberá obtener, debe encontrarse entre el rango de 90.0 – 125.0 % con un coeficiente de variación: Máx. 2.0 %.

- Precisión Intermedia

Para desarrollar este parámetro se necesitará la ayuda de otro analista, el cual preparará seis soluciones muestras bajo las mismas condiciones de operación establecidas en el protocolo de validación. Cuyo porcentaje de recuperación será de 90,0 – 125,0 % con un coeficiente de variación: Max. 2.0 %

2.2.1.15.5 Especificidad del método

La especificidad del método analítico aplicado se determinó a través de la comparación del tiempo de retención del principio activo a validar, para lo cual se dispone de una programación interna del equipo, capaz de detectar posibles interferencias en relación con:

- El disolvente
- Placebo
- Fase Móvil

2.2.1.15.6 Estabilidad de las soluciones analíticas

Para validar dicho parámetro es necesario preparar seis soluciones de las muestras, dejarlas a temperatura ambiente por un lapso de cuatro horas, posteriormente proceder a la lectura.

Dicho tiempo es establecido por las especificaciones internas; respecto a análisis efectuados a la materia prima utilizada para la elaboración de los comprimidos de RETINOL. El porcentaje de recuperación es de 85.0 – 125.0 % .Con un coeficiente de variación: Máx. 2.0%.

2.2.1.15.7 Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOC)

Los parámetros LOD y LOC se medirán al preparar tres soluciones de cada concentración al 10, 20, 30 y 40 % de un solo lote. Se procederá a realizar una regresión lineal en donde se representará la Absorbancia vs. Concentración. Interpolar el Y_{bl} .

$$\begin{aligned} \text{Límite de cuantificación} &= \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \\ \text{Límite de detección} &= \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \end{aligned}$$

2.2.1.16 Resultados

Los datos obtenidos serán evaluados, para lo cual se efectuará el tratamiento estadístico de los datos para cada uno de los parámetros de validación, finalizado este paso, se procederá a emitir el informe y certificado de validación

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, una vez realizados los diferentes análisis en el Laboratorio de Control de Calidad de la Industria Farmacéutica GINSBERG ECUADOR S.A durante el periodo Mayo-Julio del 2014 han sido distribuidos, analizados a través de tablas, representaciones gráficas. Para dicho análisis de datos se usó una hoja de cálculo en Excel, la misma que se encuentra validada internamente por la empresa farmacéutica. (Por motivos de confidencialidad de GINSBERG ECUADOR S.A. las fórmulas utilizadas para los cálculos de resultados no pueden ser publicados).

CUADRO N° 1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN PARA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
LINEALIDAD DEL METODO R CV	$\geq 0,999$ $\leq 2,0 \%$	0.9998 0.71 %
RANGO (60 %)	95 – 105% $\leq 2,0\%$	98.76 % 0.55 %
RANGO (140 %)	95 – 105% $\leq 2,0\%$	100.37 % 0.09 %
EXACTITUD (%)	95 – 105% $\leq 2,0\%$	100.08 % 0.32 %
REPETIBILIDAD DEL METODO (%)	90 – 125% $\leq 2,0\%$	98.45 % 0.11 %
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO (%)	90 – 125% $\leq 2,0\%$	99.07 % 0.67 %

ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES (4 horas)	85 – 125% ≤ 2,0%	89.46 % 0.11 %
LIMITES DE DETECCIÓN	N/A	0.152 µg/mL
LIMITES DE CUANTIFICACIÓN	N/A	0.011 µg/mL
ESPECIFICIDAD Y ROBUSTEZ	Adecuada resolución	CUMPLE

Como podemos apreciar en el cuadro N°1 se muestra los resultados obtenidos en el proceso de validación, los mismos que se encuentran dentro de las especificaciones establecidas según metodología interna de GINSBERG ECUADOR S.A. El criterio de aceptación más relevante es el coeficiente de variación, que es una comparación entre la variabilidad existente entre la media y el conjunto de valores obtenidos, en cada uno de los parámetros validados el coeficiente de variación, no debe ser mayor a 2%, dicho valor está determinado por la distribución Gaussiana. Para analizar el parámetro de linealidad se compara la relación que existe entre dos variables cuantitativas a través del coeficiente de correlación, el mismo que es de 0,999. El método analítico validado muestra un coeficiente 0,9998.

ANÁLISIS DE LINEALIDAD

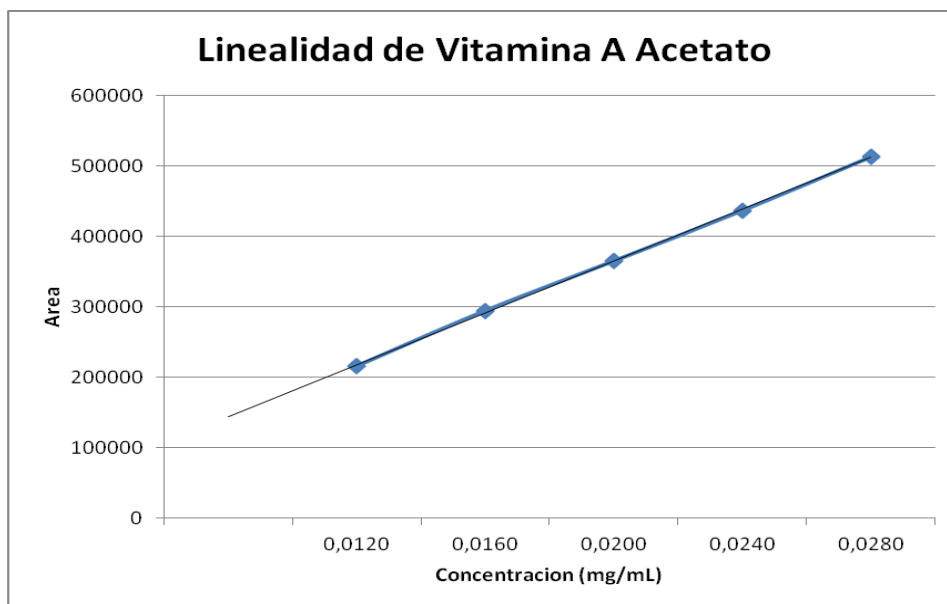
CUADRO N°2. ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014

PORCENTAJE	M	AREAS	PROMEDIO	CONCENTRACIÓN mg/ml	PROMEDIO mg/ml
60%	A1	215410.000	216313,200	0.0118017	0.0118512
	A2	217121.000		0.0118955	
	A3	218016.000		0.0119445	
	A4	215589.000		0.0118115	
	A5	215430.000		0.0118028	
80%	A6	295829.000	294849,3333	0.0162077	0.016154
	A7	295284.000		0.0161778	
	A8	293435.000		0.0160765	
100%	A9	366068.000	365343,5000	0.0200559	0.020016
	A10	364719.000		0.0199820	
	A11	363672.000		0.0199246	
	A12	364725.000		0.0199823	
	A13	366055.000		0.0200552	
	A14	366822.000		0.0200972	

120%	A15	437414.000	436902,6667	0.0239648	0.023936
	A16	436881.000		0.0239356	
	A17	436413.000		0.0239099	
140%	A18	513255.000	512969,2000	0.0281199	0.028104
	A19	513555.000		0.0281363	
	A20	512764.000		0.0280930	
	A21	512859.000		0.0280982	
	A22	512413.000		0.0280737	

Al hacer referencia al cuadro N°2 podemos apreciar los resultados obtenidos para el parámetro de validación, linealidad, en donde consideramos para dicho análisis 5 concentraciones: 60, 80, 100, 120 y 140%. En las cuales se obtuvo resultados proporcionales a la cantidad de analito o principio activo (Vitamina A) presente en la muestra. Dichos resultados servirán para efectuar la gráfica de la linealidad del método que se aprecia a continuación.

GRÁFICO N°3 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA LINEALIDAD QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014



Conc. (mg/ml)	AREA
0,0120	216313,2000
0,0160	294849,3333
0,0200	365343,5000
0,0240	436902,6667
0,0280	512969,2000

En el gráfico N°3 se muestra la linealidad que presenta el método analítico, demostrando que los resultados obtenidos son proporcionales en un intervalo de 60%-140%, ya que a medida que la concentración aumenta, incrementa el área a las diferentes concentraciones utilizadas. Podemos apreciar la ecuación de la recta es $y=183841x+71129$ y su $R^2= 0.9998$

El coeficiente de correlación lineal 0.9998 nos indica que efectivamente, existe relación entre las dos variables. Y la regresión nos permite definir la recta que mejor se ajusta a esta nube de puntos.

ANÁLISIS DEL RANGO DE TRABAJO

CUADRO N°3. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN OBTENIDA PARA EL RANGO DE 60% QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μi Conc. inicial	Xi Conc. obtenida	$\mu i - Xi$	Xi recuperación	Área VITAMINA A
1.200	1.18017	-0.01983	59.01	215410
1.200	1.18955	-0.01045	59.48	217121
1.200	1.19445	-0.00555	59.72	218016
1.200	1.18115	-0.01885	59.06	215589
1.200	1.18028	-0.01972	59.01	215430

Recuperación:	59.26
Desviación estándar	0.33
% Recuperación	98.76
Coef. Variación	0.55

El parámetro analizado, rango, se definió a través del análisis de cinco muestras, en el cuadro N°3 se observa la concentración inicial y la concentración obtenida en un rango

del 60% que es la menor concentración del intervalo utilizado para validar el método analítico. En el cual se obtuvo un 59.26% de recuperación y un 98.76% de porcentaje de recuperación, los mismos que se encuentran dentro de los criterios de referencia.

CUADRO N°4. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN OBTENIDA PARA EL RANGO DE 140% QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μ_i Conc. inicial	X_i Conc. obtenida	$\mu_i - X_i$	X_i recuperación	Área VITAMINA A
2.80	2.81199	-0.01199	140.60	513255
2.80	2.81363	-0.01363	140.68	513555
2.80	2.80930	-0.00930	140.46	512764
2.80	2.80982	-0.00982	140.49	512859
2.80	2.80737	-0.00737	140.37	512413

Recuperación:	140.52
Desviación estándar	0.12
% Recuperación	100.37
Coef. Variación	0.09

En el cuadro N°4 se presenta los resultados para el porcentaje mayor del intervalo utilizado para la validación, al 140%, en el cual se obtiene una desviación estándar de 0.12 que significa que los datos obtenidos no presenta una diferencia significativa con respecto al promedio. Un coeficiente de variación de 0.09% todos dichos valores se encuentren dentro de los valores de referencia. Dicho valor es bajo ya que se obtuvo una recuperación de 140.52% lo que nos indica que los solventes de extracción y el método utilizado es óptimo.

ANÁLISIS DE LA EXACTITUD

CUADRO N°5. ANÁLISIS DE LA EXACTITUD QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μ_i Conc. Inicial	X_i Conc. Obtenida	$\mu_i - X_i$	X_i recuperación	Área VITAMINA A
2.000	2.00559	-0.00559	100.28	366068
2.000	1.99820	0.00180	99.91	364719
2.000	1.99246	0.00754	99.62	363672
2.000	1.99823	0.00177	99.91	364725
2.000	2.00552	-0.00552	100.28	366055
2.000	2.00972	-0.00972	100.49	366822

Recuperación:	100.08
Desviación estándar	0.32
% Recuperación	100.08
Coef. Variación	0.32

Al medir el grado de concordancia entre las muestras analizadas a concentración del 100%, se obtuvo los resultados que se indican en el cuadro N°5 donde se muestra que el método es exacto ya que no existe diferencia entre las muestras analizadas, al tener una desviación estándar y coeficiente de variación de 0.32, el criterio de aceptación es $\leq 2\%$, es decir se encuentra bajo el límite de referencia establecidos internamente.

CUADRO N°6. ANÁLISIS DE LA EXACTITUD QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, CON TRES CONCENTRACIONES (80,100,120%), EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

% Teórico	% de Recuperación		
80	101.30	101.11	101.30
100	100.28	99.62	100.28
120	99.85	99.62	99.62

Promedio	100.33
Desv. Est.	0.73
Coef. Var.	0.72

Para determinar la exactitud a parte de las seis soluciones analizadas al 100% también se preparó tres muestras a las concentraciones del 80, 100 y 120% se concluyó que independientemente de las concentraciones, se aprecia la concordancia de los resultados, encontrándose dichos resultados bajo los criterios aceptados en la validación.

ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN

CUADRO N°7. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

MUESTRA	RESPUESTA
1	366068.000
2	364719.000
3	363672.000
4	364725.000
5	366055.000
MEDIA	365047.80
DES. STD	1019.85229
CV	0.279375001

Al efectuar un análisis de cinco muestras del estándar se pretende ver el grado de precisión, para lo cual se pesó 25,1 mg de estándar de Vitamina A acetato, con una pureza de 102.29% y una humedad del 3%, se obtuvo las áreas del respectivo análisis, como se muestra en el cuadro N°7, se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación, los mismos que se encuentran bajo los valores de referencia definidos internamente.

CUADRO N°8. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN (REPETIBILIDAD), QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μi Conc. inicial	Xi Conc. obtenida	$\mu i - Xi$	Xi recuperación	Área VITAMINA A
0.020	0.01969	0.00031	98.44	359367
0.020	0.01970	0.00030	98.51	359617
0.020	0.01967	0.00033	98.33	358954
0.020	0.01967	0.00033	98.34	358984
0.020	0.01969	0.00031	98.46	359434
0.020	0.01972	0.00028	98.62	360014

Recuperación:	98.45
Desviación estándar	0.11
% Recuperación	98.45
Coef. Variación	0.11

En el cuadro N°8 hace referencia al estudio realizado a seis muestras que nos facilita determinar si el método es preciso, es decir si los resultados una vez analizados bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (el mismo día), por el mismo analista, en la misma muestra homogénea y el mismo equipo son próximos entre sí. Al finalizar dicho análisis el método analítico es preciso con un coeficiente de variación de 0,11 que se encuentra bajo los criterios de referencia, al no ser mayor a 2%.

CUADRO N°9. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD), QUE PRESENTA EL MÉTODO ANALÍTICO, EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μi Conc. inicial	Xi Conc. obtenida	$\mu i - Xi$	Xi recuperación	Área VITAMINA A
0.020	0.01998	0.000025	99.88	364596
0.020	0.01995	0.000046	99.77	364203
0.020	0.01995	0.000055	99.73	364051
0.020	0.01992	0.000084	99.58	363509
0.020	0.01994	0.000063	99.69	363900
0.020	0.01991	0.000093	99.54	363353

Recuperación	99.07
Desviación estándar	0.66
% Recuperación	99.07
Coef. Variación	0.67

En lo que respecta al cuadro N°9 se aprecia que los ensayos se efectuaron a seis muestras a concentración al 100%, para lo cual se modificó una condición de operación, al ser desarrollada por otro analista, en lo que refiere preparación de muestra, manteniéndose las otras condiciones de operación intactas, al comparar los resultados con el cuadro N°8 no existe diferencia amplia, y el coeficiente de variación y desviación estándar se encuentra bajo el valor de referencia, es decir no existe variabilidad significativa entre uno u otro analista, definiéndolo como un método analítico reproducible.

ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD

CUADRO N°10. ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO ANALITICO FRENTE A LOS DIFERENTES PARÁMETROS ANALIZADOS

PARÁMETRO ANALIZADO	RESULTADO
Interferencia hallada frente a la fase móvil	No presenta
Interferencia hallada frente al solvente	No presenta
Interferencia hallada frente al placebo	No presenta

Lo que se pretende demostrar con el cuadro N°10 es que el método analítico no presenta áreas significativas cuantificables que interfieran con el área de vitamina A acetato, al ser comparada con el solvente utilizado para la preparación de las muestras, que en nuestro caso fue agua con etanol (15:85), fase móvil preparada por acetonitrilo: metanol relación (50:50) y como última instancia con el placebo preparado en condiciones iguales a la muestra.

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD

CUADRO N°11 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD, QUE PRESENTA LA VITAMINA A, EN RETINOL COMPRIMIDOS, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA GINSBERG ECUADOR S.A, QUITO, 2014.

μi Conc. inicial	Xi Conc. obtenida	$\mu i - Xi$	Xi % recuperación	Área VITAMINA A
0.020	0.01791	0.00209	89.55	326883
0.020	0.01790	0.00210	89.51	326768
0.020	0.01788	0.00212	89.41	326388
0.020	0.01790	0.00210	89.50	326722
0.020	0.01786	0.00214	89.31	326018

% Recuperación	89.46
Desviación estándar	0.10
Coef. Variación	0.11

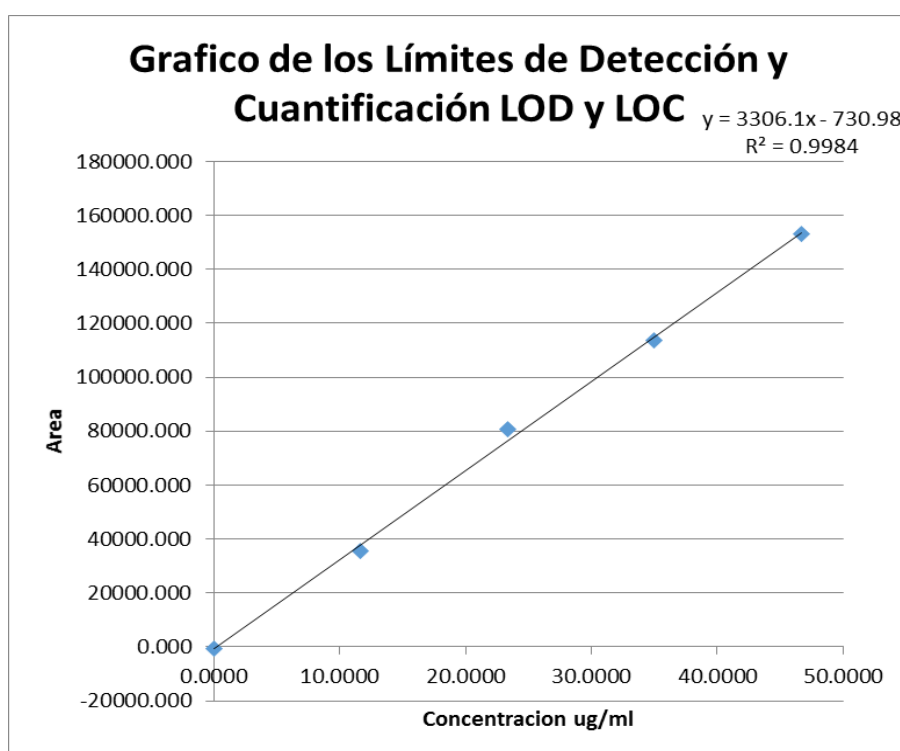
Para determinar si la vitamina A acetato es estable se procede a analizar seis muestras después de 4 horas de preparadas, el tiempo para verificar su estabilidad y robustez se atribuye a la labilidad de las vitaminas, es decir que factores como: calor, luz, oxígeno, ácido, álcali, agentes reductores, agentes oxidantes, iones metálicos, afectan directamente a la estabilidad de las vitaminas, como a la robustez del método. Al observar los resultados en el cuadro N°11, apreciamos que el porcentaje de recuperación es de 89.46 % el cual si disminuyó en comparación con las muestras analizadas sin reposo a temperatura ambiente que fue de 98.45%, lo cual se atribuye a la labilidad de las vitaminas al ser sensibles a la luz, por ello se recomienda usar blíster ámbar para evitar degradación prematura del principio activo, a más de almacenarla a temperatura que no mayor a 30°C, en un lugar fresco y seco. Pero dicho resultado se encuentra bajo los criterios de aceptación establecidos internamente.

ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

CUADRO N°12. ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN (LOD) Y CUANTIFICACIÓN (LOC) DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO

Concentración	11.68 µg/mL	23.36 µg/mL	34.96 µg/mL	46.72 µg/mL
Área 1	35525.000	80593.000	113565.000	153205.000
Área 2	35627.000	80514.000	113657.000	153225.000
Área 3	35623.000	80611.000	113557.000	153198.000
Promedio	35591.667	80572.667	113593.000	153209.333
Desviación Estándar	57.76966	51.59780	55.56978	14.01190

GRÁFICO N°4 REPRESENTACION GRÁFICA DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITES DE CUANTIFICACIÓN (LOC) PARA EL MÉTODO ANALÍTICO EN LA VALORACIÓN DE VITAMINA A ACETATO



En lo que refiere al cuadro N°12 y el grafico N°4 son resultado del análisis para determinar los límites de detección y cuantificación a concentraciones del 10, 20, 30 y 40%, en donde se evaluará cual es la mínima cantidad que se puede cuantificar y detectar bajo las condiciones de operación propuestas con una linealidad, precision y

exactitud adecuadas. Para cada una de las concentraciones se efectuó tres inyecciones, cuyas áreas se encuentran en el cuadro N°12, con este dato y con las concentraciones de las muestras se determinó la ecuación de la recta y se extrapoló la respuesta a concentración cero (Y_{bl}). Siendo el límite de detección de 0.152 $\mu\text{g/mL}$ y el de cuantificación de 0.011 $\mu\text{g/mL}$.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES

1. El parámetro de repetibilidad para la Vitamina A Acetato (Retinol) fue evaluado en la validación, mostrando resultados que se encuentran dentro de los límites establecidos Max. 2,0% para el coeficiente de variación, así como también el porcentaje de recuperación que se encuentra dentro de 90 a 125 %. De igual manera para el parámetro de estabilidad se obtuvo resultados dentro de los rangos aceptados, mostrando que las muestras analizadas en un lapso de cuatro horas de almacenamiento a temperatura ambiente no se ve afectado por factores como: calor; luz, oxígeno, es decir el tratamiento que se efectúa a través de dicho método analítico es fiable.
2. Se concluye que el método analítico validado es lineal dentro del rango de concentración del 60%-140%, rango definido internamente por la empresa farmacéutica. En dicho rango el método analítico validado presentó un coeficiente de correlación de 0.9998, por lo cual se atribuye que dentro del rango se obtuvo resultados directamente proporcionales, al efectuar la respectiva gráfica de la linealidad en donde se compara la concentración vs el área bajo la curva de los picos correspondientes a la Vitamina A acetato (ver cuadro N°2 y gráfica N°3).
3. Se determinó que el método analítico es reproducible, ya que al ser analizado el mismo tipo de muestras por otro analista se obtuvo resultados similares, con un

coeficiente de variación de 0.66% que se encuentra dentro de los criterios de aceptación.

Al mismo tiempo se valoró que el método analítico en las condiciones de operación planteadas es capaz de detectar y cuantificar una cantidad mínima de 0.152 µg/mL y 0.011 µg/mL con respecto al principio activo presente en las soluciones preparadas.

4. El método analítico utilizado es robusto, preciso y exacto ya que se obtienen resultados adecuados y sin diferencia significativa con respecto a muestras entre los lotes respectivos, con lo cual se pudo llevar a cabo la validación correctamente y obteniendo resultados dentro de especificación de validación.
5. De los análisis realizados se concluye que el método de valoración de VITAMINA A ACETATO en RETINOL 50000 UI COMPRIMIDOS por Cromatografía líquida HPLC, descrito en el presente documento, CUMPLE con los criterios de aceptación de los parámetros de validación del método analítico por lo que se considera VALIDADO EL MÉTODO.
6. Se obtuvo evidencia documental del proceso de validación del método analítico para valoración de Vitamina A acetato en Retinol 50000 UI comprimidos, que consta de: un protocolo, informe y certificado de validación. Los mismos que fueron revisados y aprobados por la dirección técnica de la empresa GINSBERG ECUADOR S.A.

CAPÍTULO V

5 RECOMENDACIONES

- 1.** Para llevar a cabo el proceso de validación, se recomienda previa su ejecución revisar el método analítico utilizado en el laboratorio de control de calidad de existir, caso contrario, reunir toda la bibliografía posible para el principio activo a validar.
- 2.** Se recomienda previo a la realización del proceso de validación, elaborar un protocolo de validación, documento que detalla paso a paso el proceso a seguir. Dicho documento debe ser revisado y aceptado por la dirección técnica de la empresa farmacéutica GINSBERG ECUADOR S.A. paso previo al desarrollo de la validación del método a validar.
- 3.** Para dar inicio al proceso de validación es recomendable reunir todo el material necesario, en nuestro caso utilizar material ámbar, por ser el principio activo una vitamina fotosensible, de esta forma garantizaremos la veracidad de los resultados.
- 4.** Con la prioridad de obtener resultados confiables es necesario preparar el equipo HPLC, columna cromatográfica, con el objeto de estabilizarlos con la fase móvil que será utilizada durante la validación.

5. Se recomienda realizar pruebas previas con el estándar y muestras al 100%, para verificar si el método analítico es óptimo para el principio activo y da como resultado un pico cuantificable y adecuada resolución.
6. Una vez culminado el proceso de validación se debe lavar adecuadamente la columna y el equipo, de acuerdo a la fase móvil utilizada, dejándolos en condiciones para posterior uso.
7. De existir cambios en la metodología, se recomienda reportarlo en el informe a desarrollarse. Dicho informe será elaborado con el equipo de control de calidad y el área de validaciones y debe ser revisado por la dirección técnica.

BIBLIOGRAFIA

BROWN, L. CHALLEM, J. 2007. Vitaminas y Minerales esenciales para la salud. Madrid- España. Nowtilus. Pp. 9-15, 41

BERNAL, B y otros. 2010. Cromatografía Líquida de Alta Resolución Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Métodos cuantitativos. 2a ed. México. Akal. Pp. 14

CALVO, D. 2005. Formulario Nacional de Medicamentos Retinol (Vitamina A). Cuba. Infomed. Pp. 1-2

http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/164.HTM

2014-08-21

CASTILLO, F. CÁRENAS, J. 1991. Vitaminas hidrosolubles y Bioquímica, aspectos estructurales y vías metabólicas. 2a ed. España- Madrid. Nowtilus. Pp. 15-21

CROMATOGRAFÍA DE ALTA EFICIENCIA. URIBE, R. 2013

http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.html

2014-03-27

DUFFAU, B. y otros. 2010. Validación de métodos y Determinación de la incertidumbre de la medición, Metrología Ambiental y Alimentos. Suecia. Sección. Pp. 166-169

ENTRALA, A. 2007. Vitaminas Aspectos prácticos en Medicina. Barcelona. Díaz de Santos. Pp. 67-93

FORMAS FARMACÉUTICAS. VERGES, E. 2011

<http://www.ugr.es/~adolfina/asignaturas/formasfarmaceuticasRFE.html>

2014-05-11

GARCÍA, E. 2001. Optimización, Validación y Modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. 3a ed. México. Akal. Pp. 14

GINSBERG S.A. 2014. Metodología Interna. Quito-Ecuador

GINSBERG ECUADOR S.A. 2014. Instructivos de trabajo Validación de métodos, procesos y limpieza AC-05-004. Quito-Ecuador

GINSBERG ECUADOR S.A. 2014. Instructivos de trabajo Protocolo de Validación de Método Analítico de Vitamina Acetato en Retinol 50000 UI Comprimidos. AC-05-05-049.1. Quito-Ecuador

GINSBERG ECUADOR S.A. 2014. Instructivos de trabajo Plan Maestro de Validaciones. Quito-Ecuador

INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA. GISMERA, M. 2009

http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.html

2014-05-11

LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA EN EL ECUADOR: MIRANDO HACIA ADELANTE. PAVON, A. 2011

http://www.espae.espol.edu.ec/images/documentos/publicaciones/publicaciones_medios/EyE_Industria_Farmaceutica_2011.html

2014-05-12

NUEVA GUÍA DE VALIDACIÓN DE PROCESOS DE LA FDA REACCIÓN DE LA INDUSTRIA, PREGUNTAS Y RETOS. BASEMAN, H y otros. 2011

http://www.pharmatechespanol.com.mx/articulo/500.nueva_guia_de_validacion_de_procesos_de_la_fda_reaccion_de_la_industria_preguntas_y_retos.html

2014-05-11

ORTEGA, L. y otros. 2001. Validación de Métodos Analíticos. México. AEFI. Pp. 23-36

PENNISTON, K. TANUMIHARDJO, S. 2006. The acute any chronic effects of vitamin A. Am J. 3a ed. Inglaterra. Clin Nutr. Pp. 83, 191-201

REGLAMENTO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS NATURALES.

VANCE, C. 2013

<http://www.lacamara.org/ccg/Reglamento%20de%20Medicamentos%20y%20Productos%20Naturales.html>

2014-05-13

SÁNCHEZ, A. 2008. Vitaminas y Multivitamínicos. 2a ed. México. Consumidor. Pp. 66

SOUCCAR, T. 2001. La revolución de las Vitaminas. Barcelona. Paidotribo. Pp. 326

SUÑE, J. y otros. 2001. Optimación, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Barcelona. Lloc Facultad de Farmacia. Pp. 3-17

TIPOS DE DETECTORES DE HPLC. DENMAR, D. 2013

http://www.ehowenespanol.com/tipos-detectores-hplc-lista_92703/

2014-09-05

VELASTEGUÍ, J. 2011. (tesis). Validación del Método Analítico de Valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Pp. 131-135

VITAMINAS CON FUNCIONES COENZIMÁTICAS EN EL METABOLISMO INTERMEDIARIO. MATAIX, J. SANCHEZ, F. 2000

http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix/vitaminas.html

2014-05-11

VITAMINAS HIDROSOLUBLES. HERILLA, E. 2010

http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Hernande%20Rodriguez/vitaminas.

VITAMINAS LIPOSOLUBLES. CODOCEO, R. MUÑOZ, R. 2001

http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Hernande%20Rodriguez/vitaminas.html

2014-05-11

VITAMINA A (RETINOL). CAPITAN, H. 2010

<http://www.vademecum.es/principios-activos-retinol+%28vitamina+a%29-a11ca01>

2014-08-21

VITAMINA A. ENGEL, P. 2012

<http://www.nutri-facts.org/esp/vitaminas/vitamina-a-retinol/seguridad/>

2014-05-11

WATERS CORPORATION. Atlantis Columns. CUEVA, A. 2004

<http://www.cienytech.com/tablas/Atlantis%20Libro%20Aplicaciones.>

2014-10-03

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL PROCESO DE VALIDACIÓN

MUESTRA	PREPARACIÓN	CONC.	LECTURAS	PARÁMETRO	OBSERVACIONES
Solución Estándar 1	Pese por duplicado con exactitud 25,0 mg de Vitamina A en un balón aforado de 50,0 ml, agregar 30,0 ml de disolvente, ultrasonar por 10 minutos o hasta disolución completa, enfríe y lleve aforo con disolvente. Tomar una alícuota de 2 ml en un balón aforado de 50 ml.	100 %	1	Linealidad, Rango, Exactitud	Leer el mismo día de la preparación.
Solución Estándar 2	Igual a la solución Estándar 1	100%	1	Reproducibilidad del Estándar 1	Leer luego del Estándar 1
Soluciones A1 – A6	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 145.34 mg de polvo equivalente a 25 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforo a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	100 %	1 1 1 1 1	Linealidad y Exactitud	Leer el mismo día de la preparación.
A7 A8 A9 A10 A11	Triturar en un mortero comprimidos de Retinol hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 87.204 mg de polvo equivalente a 15 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un	60 %	1 1 1 1	Linealidad	Leer el mismo día de la preparación.

	balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.				
A12 A13 A14	Triturar en un mortero comprimidos de Retinol hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 116.272 mg de polvo equivalente a 20 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	80 %	1 1 1	Linealidad	Leer el mismo día de la preparación.
A15 A16 A17	Triturar en un mortero comprimidos de Retinol hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 174.408 mg de polvo equivalente a 30 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	120 %	1 1 1	Linealidad	Leer el mismo día de la preparación.
A18 A19 A20 A21 A22	Triturar en un mortero comprimidos de Retinol hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 203.476 mg de polvo equivalente a 35 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	140 %	1 1 1 1 1	Linealidad y Exactitud	Leer el mismo día de la preparación.
Solución Estándar 3	Igual a la solución estándar 1.	100 %	5	LOD-LOC Repetibilidad	Leer el mismo día de la preparación.
Solución Estándar 4	Igual a la solución estándar 1.	100 %	2	Repetibilidad	Leer el mismo día de la preparación.

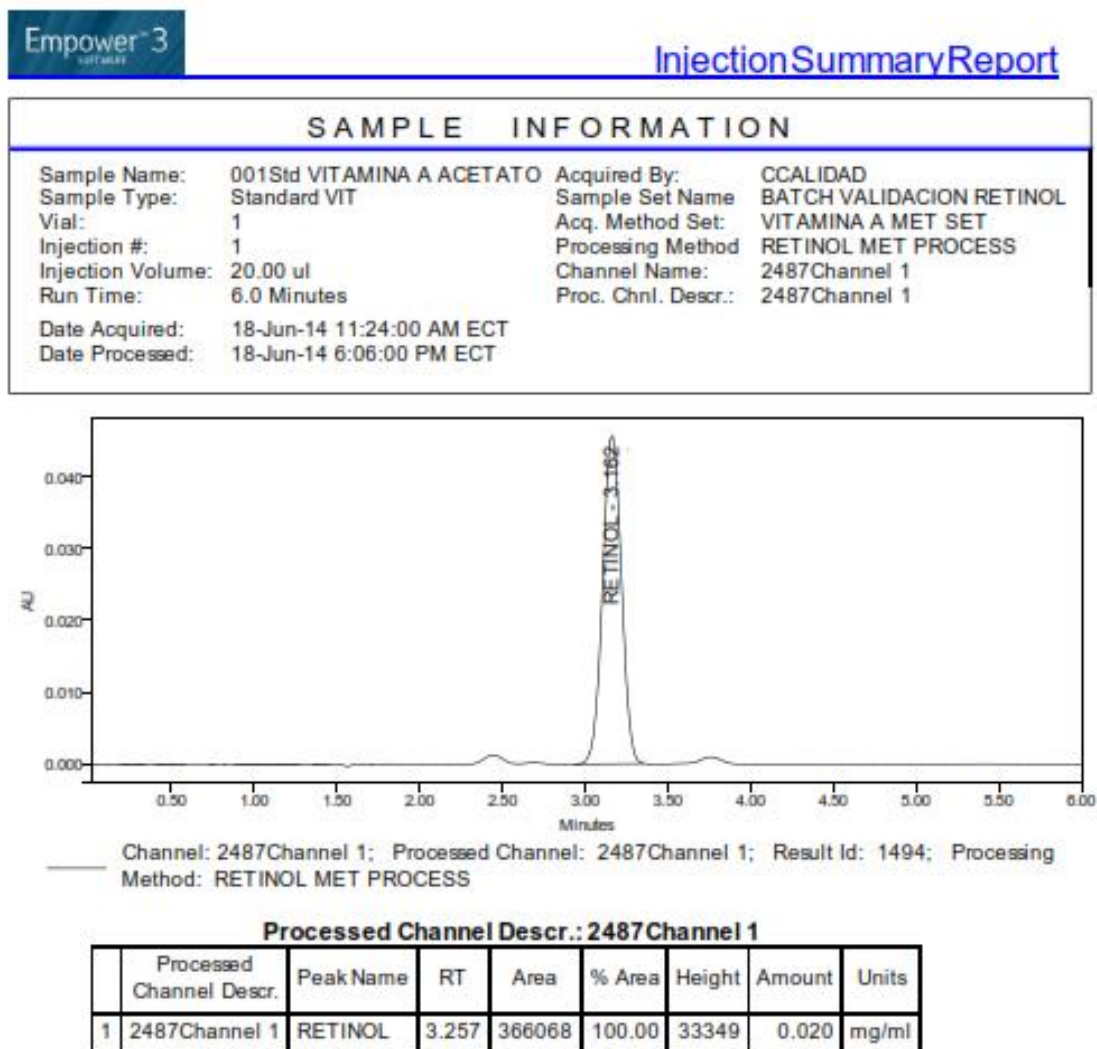
B1 B2 B3 B4 B5 B6	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 145.34 mg de polvo equivalente a 25 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	100 %	1 1 1 1 1 1	Repetibilidad	Leer el mismo día de la preparación.
C1 C2 C3 C4 C5 C6	Leer las muestras del análisis de repetibilidad luego de las 4 horas mantenidas a temperatura ambiente	100 %	1 1 1 1 1 1	Estabilidad	Leer luego de 4 horas
D1	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 14.534 mg de polvo equivalente a 2.5 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	10 %	3	Límite de detección y Límite de cuantificación.	Leer el mismo día de la preparación.
D2	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 29.068 mg de polvo equivalente a 5.0 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	20 %	3	Límite de detección y Límite de cuantificación.	Leer el mismo día de la preparación.
D3	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un	30%	3	Límite de detección y Límite de	Leer el mismo día de la preparación.

	mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 43.602 mg de polvo equivalente a 7.5 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.			cuantificación.	
D4	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 58.136 mg de polvo equivalente a 10 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforado a volumen con disolvente, mezclar, homogenizar.	40%	3	Límite de detección y Límite de cuantificación.	Leer el mismo día de la preparación.

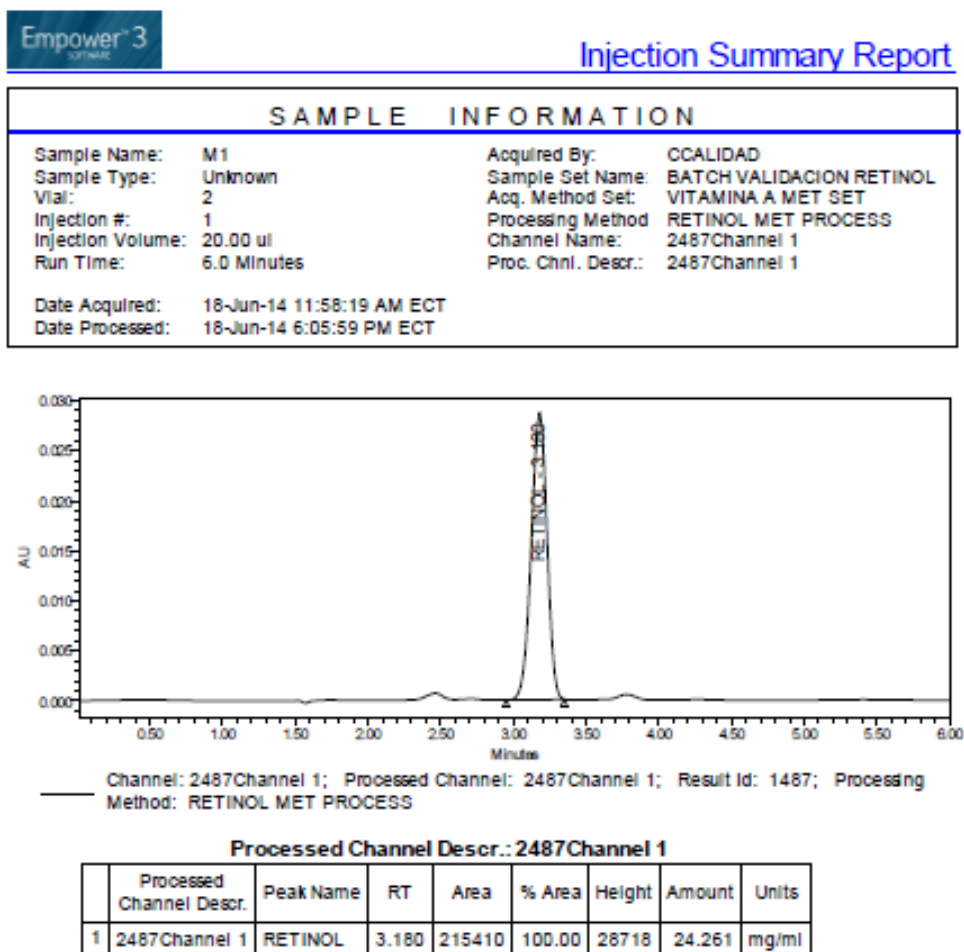
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL PROCESO DE VALIDACIÓN POR OTRO ANALISTA

MUESTRA	PREPARACIÓN	CONC.	LECTURAS	PARÁMETRO	OBSERVACIONES
Solución Estándar 5	Pese por duplicado con exactitud 25,0 mg de Vitamina A en un balón aforado de 50,0 ml, agregar 30,0 ml de disolvente, ultrasonar por 10 minutos o hasta disolución completa, enfríe y lleve aforo con disolvente. Tomar una alícuota de 2 ml en un balón aforado de 50 ml.	100 %	1	Reproducibilidad	Leer el mismo día de la preparación.
Solución Estándar 6	Igual a la solución estándar 5.	100 %	1	Reproducibilidad	Leer el mismo día de la preparación.
F1 F2 F3 F4 F5 F6	Determinar el peso promedio de 10 comprimidos. Triturarlos en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Pesar 145.34 mg de polvo equivalente a 25 mg de Vitamina A acetato en un balón aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 25 ml de disolvente, ultrasonar, diluir con disolvente, homogenizar y aforar. Tomar una alícuota de 2 mL en un balón de 50 mL aforar, mezclar, homogenizar.	100 %	1 1 1 1 1 1	Reproducibilidad	Leer el mismo día de la preparación.

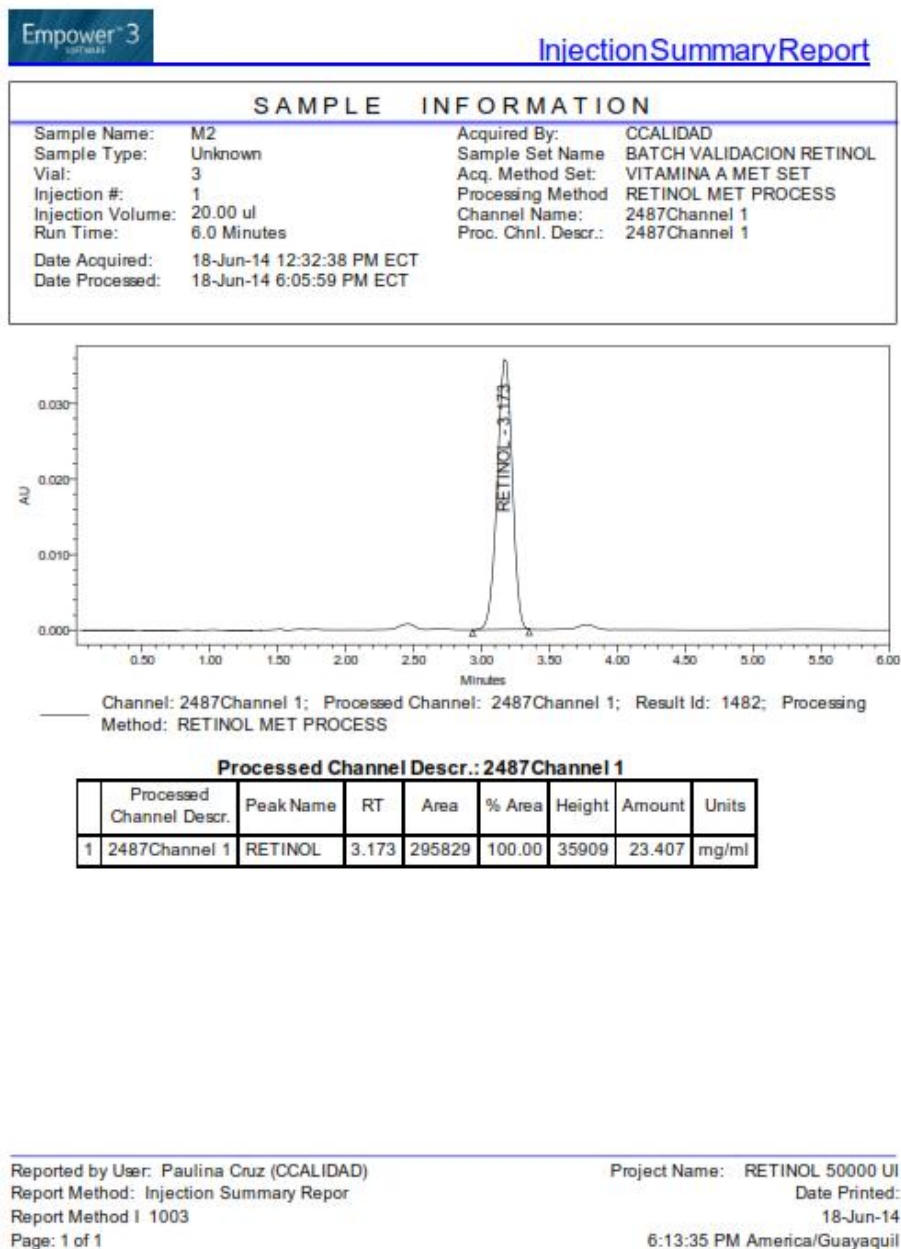
ANEXO 3. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE VITAMINA A ACETATO



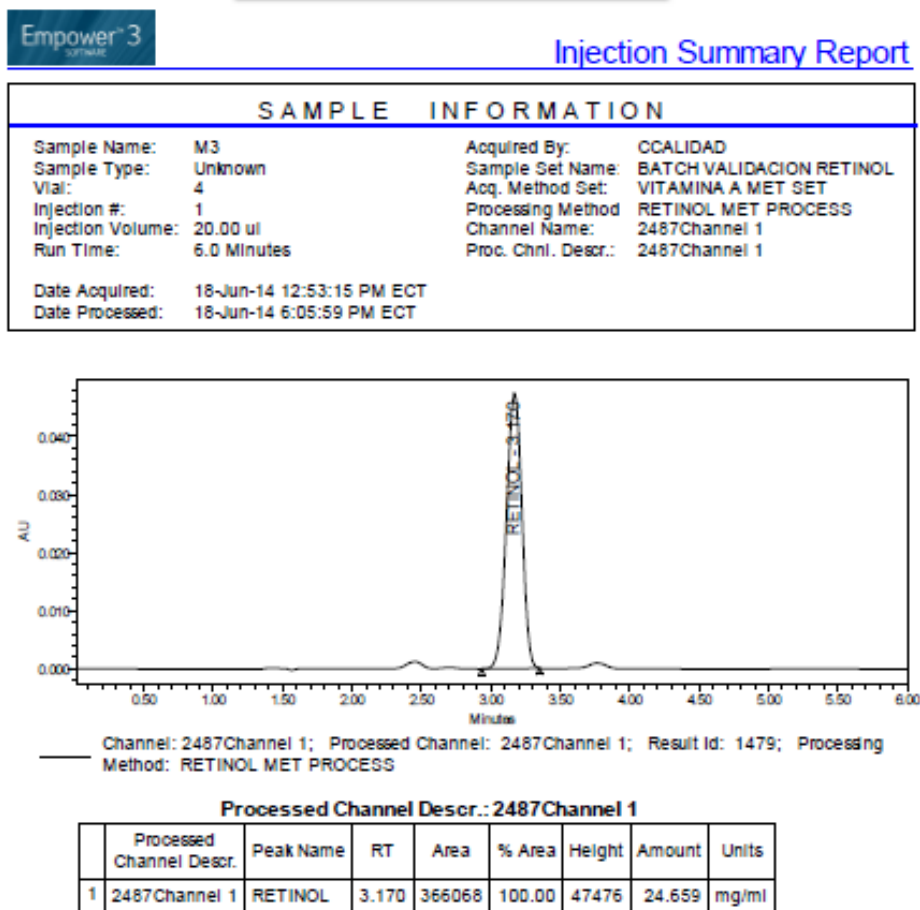
ANEXO 4. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 60%



ANEXO 5. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 80%



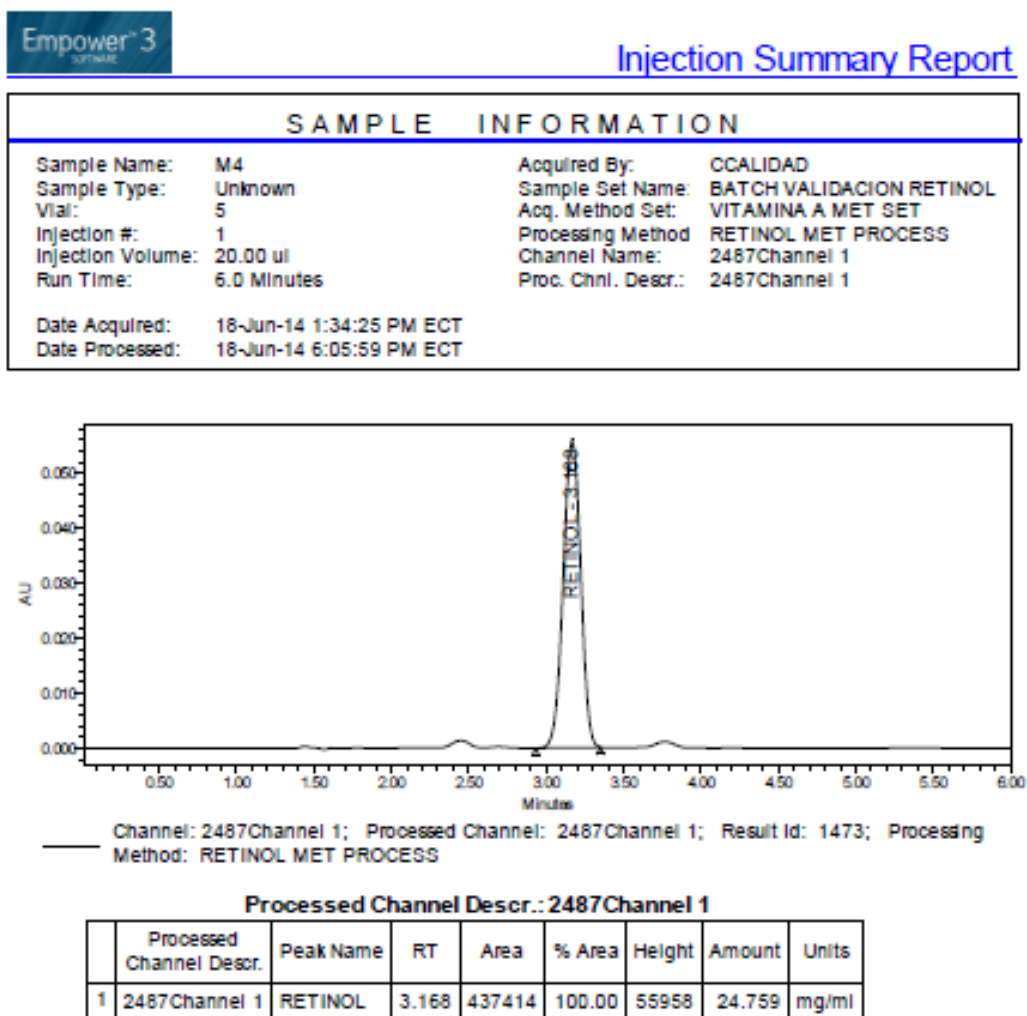
ANEXO 6. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 100%



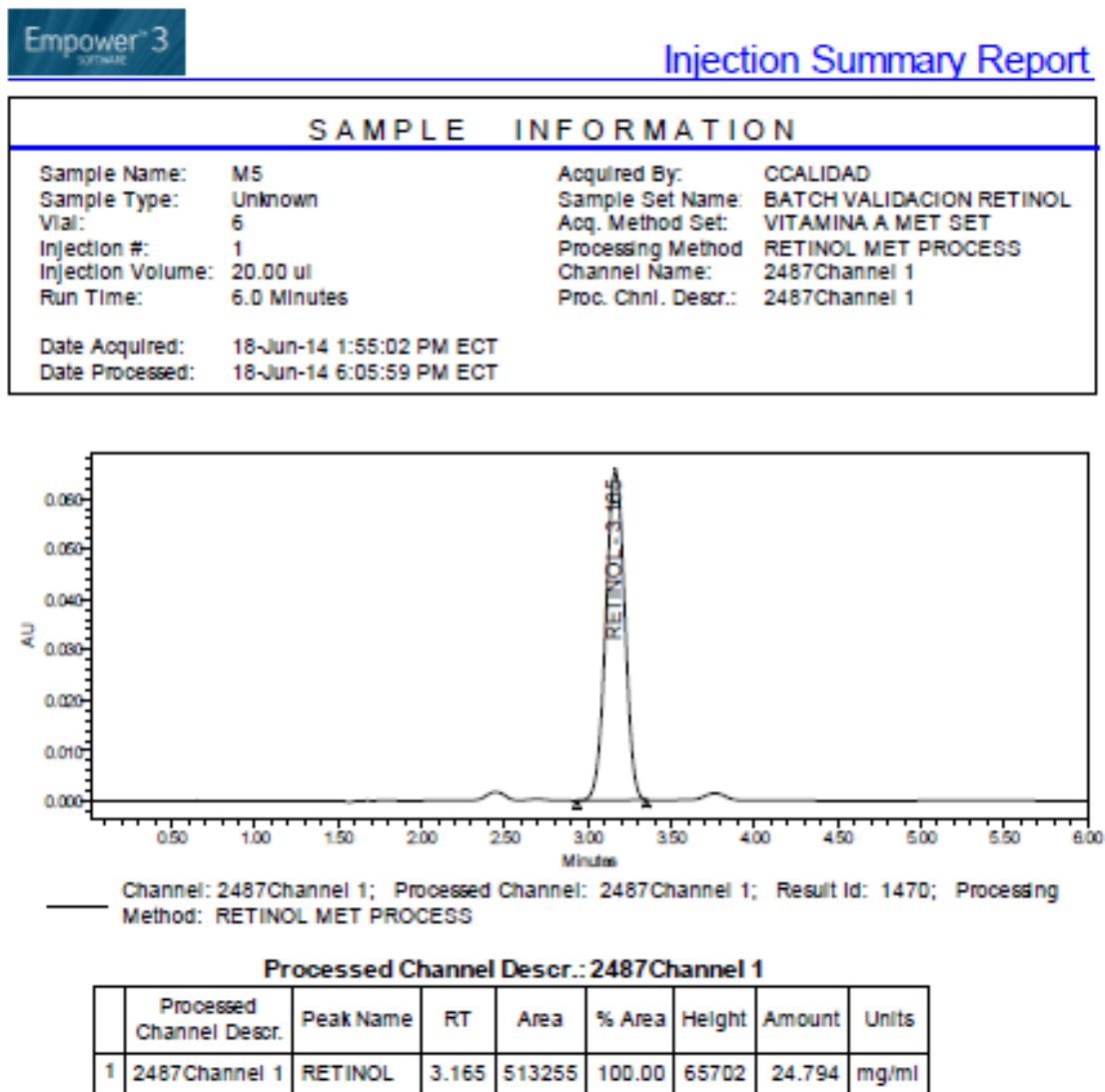
Reported by User: Paulina Cruz (CCALIDAD)
 Report Method: Injection Summary Report
 Report Method IC1003
 Page: 1 of 1

Project Name: RETINOL 50000 UI
 Date Printed:
 18-Jun-14
 6:13:47 PM America/Guayaquil

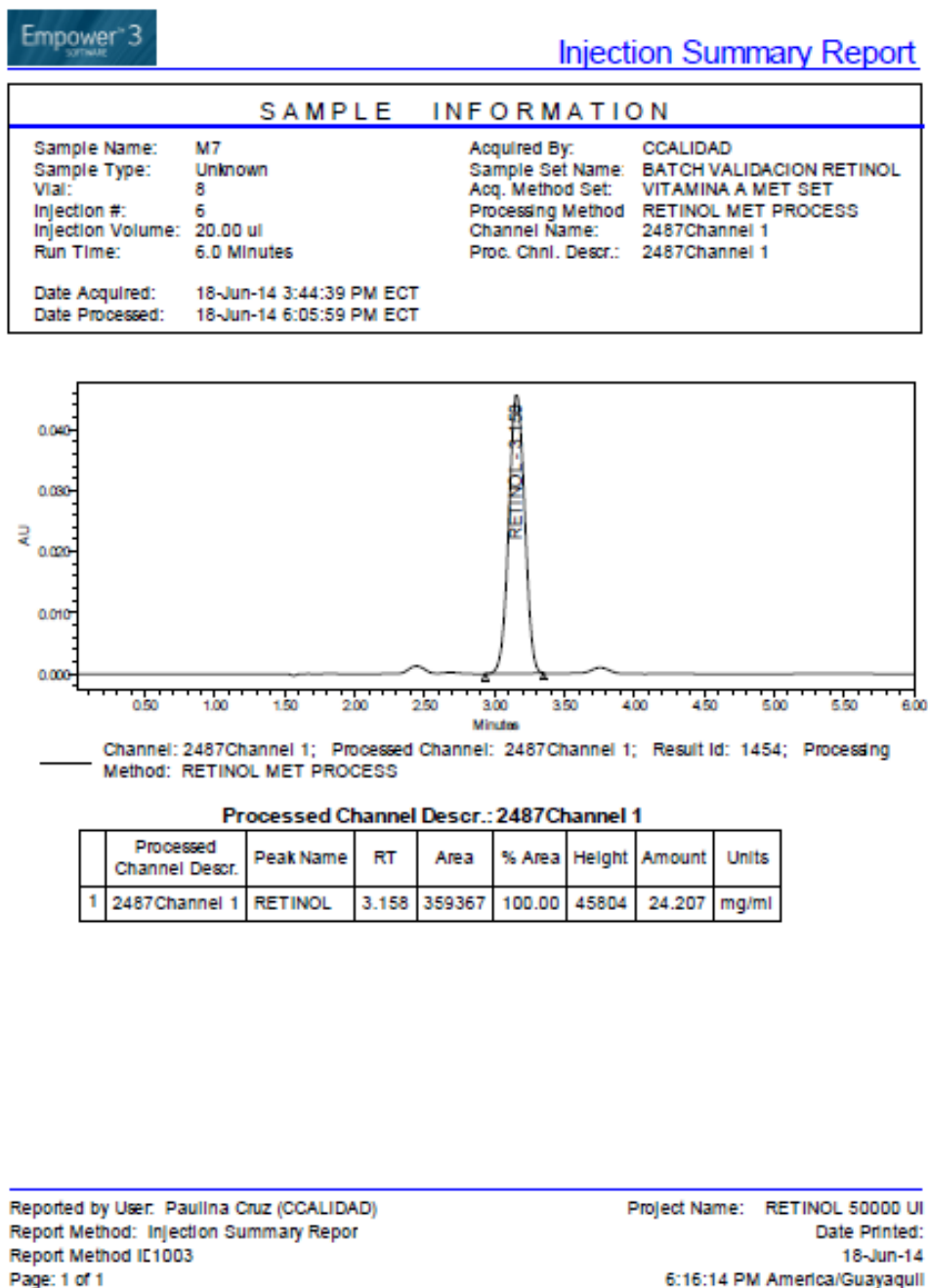
ANEXO 7. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 120%



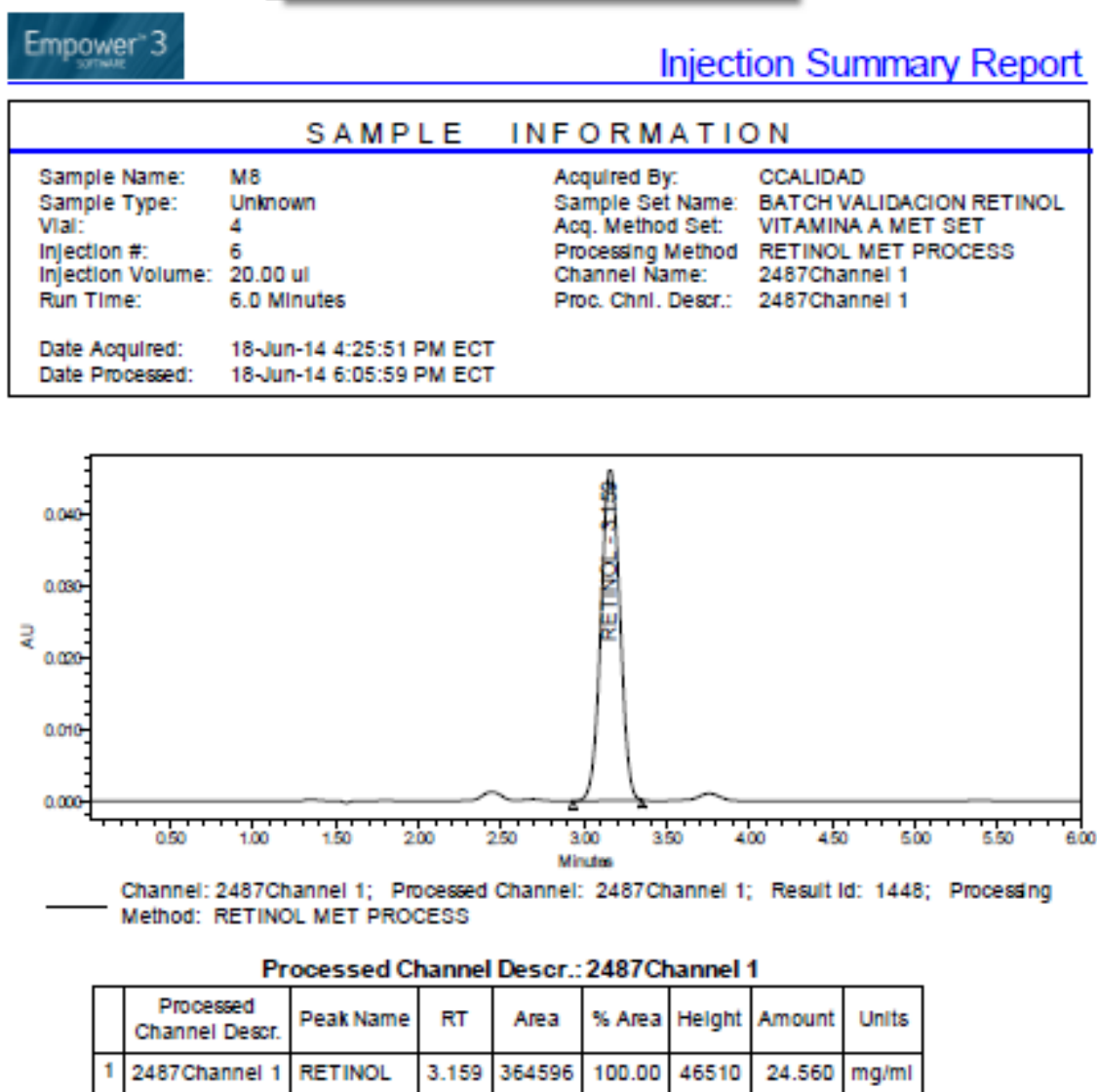
ANEXO 8. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LINEALIDAD A CONCENTRACIÓN DEL 140%



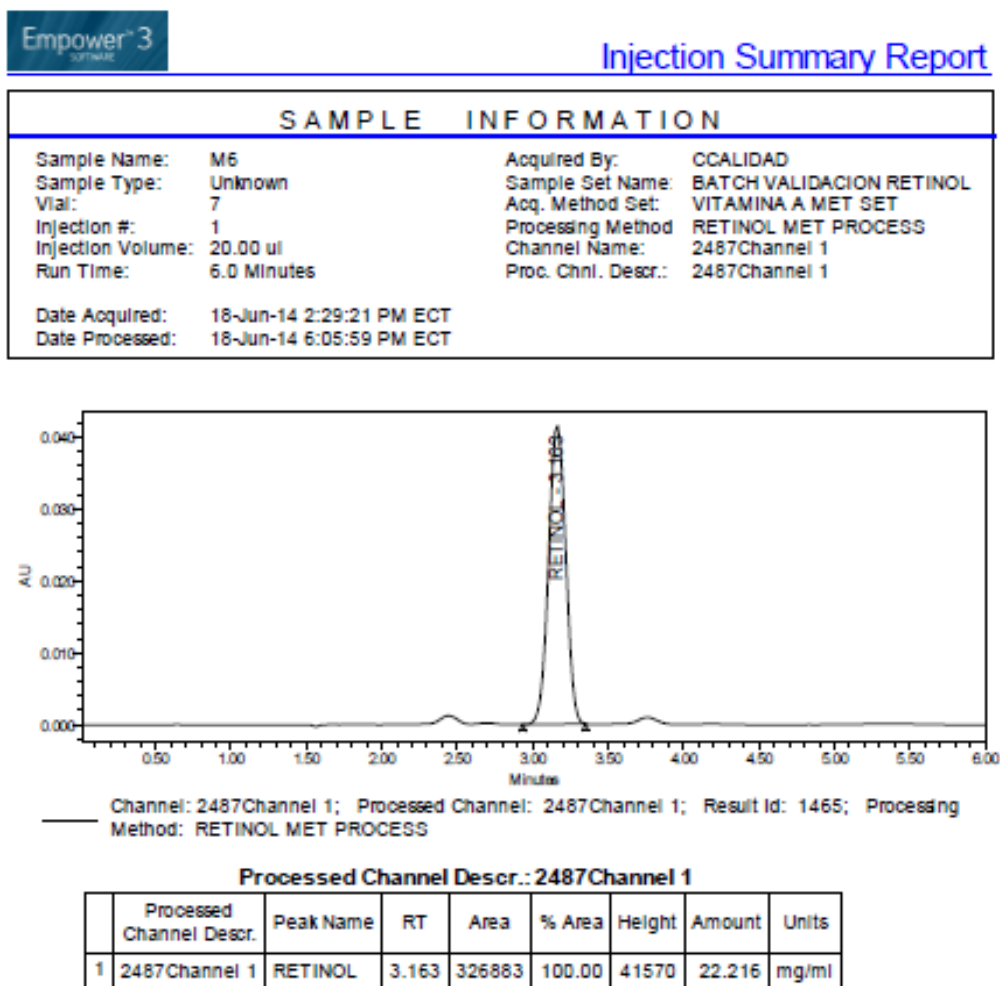
ANEXO 9. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA REPETIBILIDAD (PRECISIÓN)



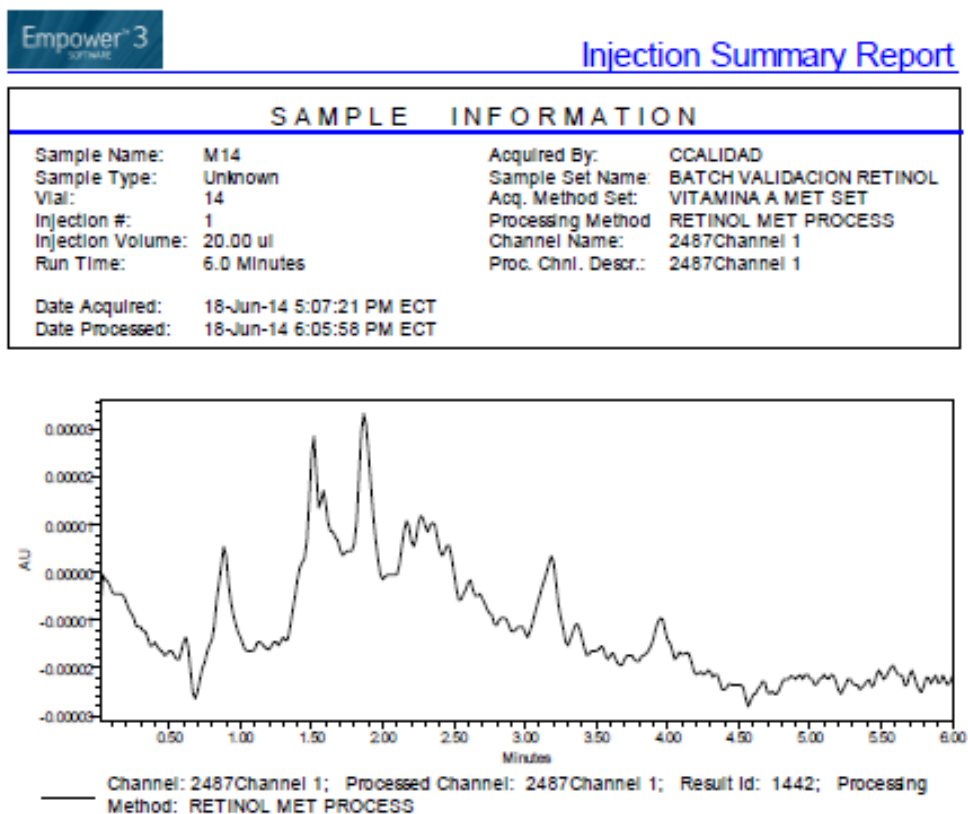
ANEXO 10. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA REPRODUCIBILIDAD



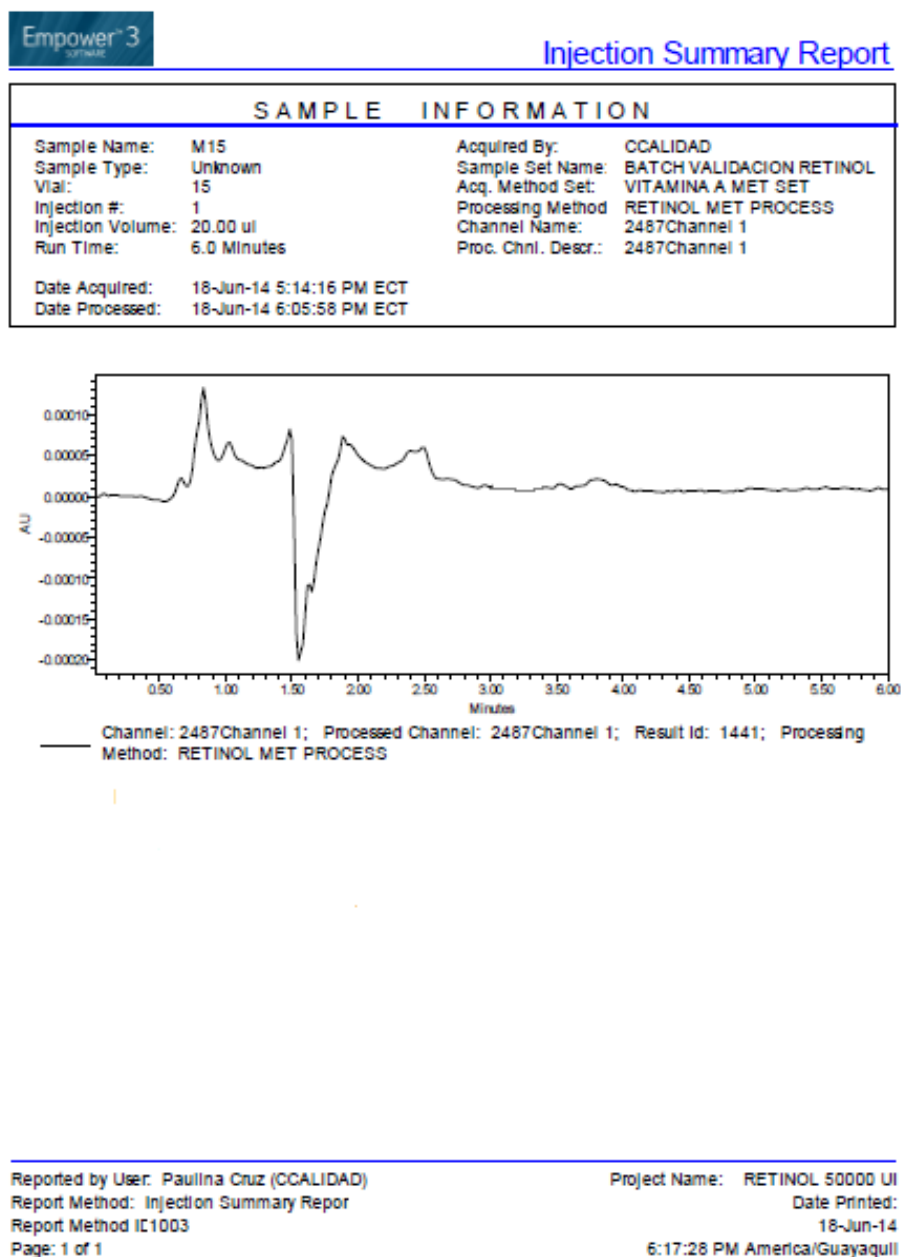
ANEXO 11. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS PARA LA ESTABILIDAD



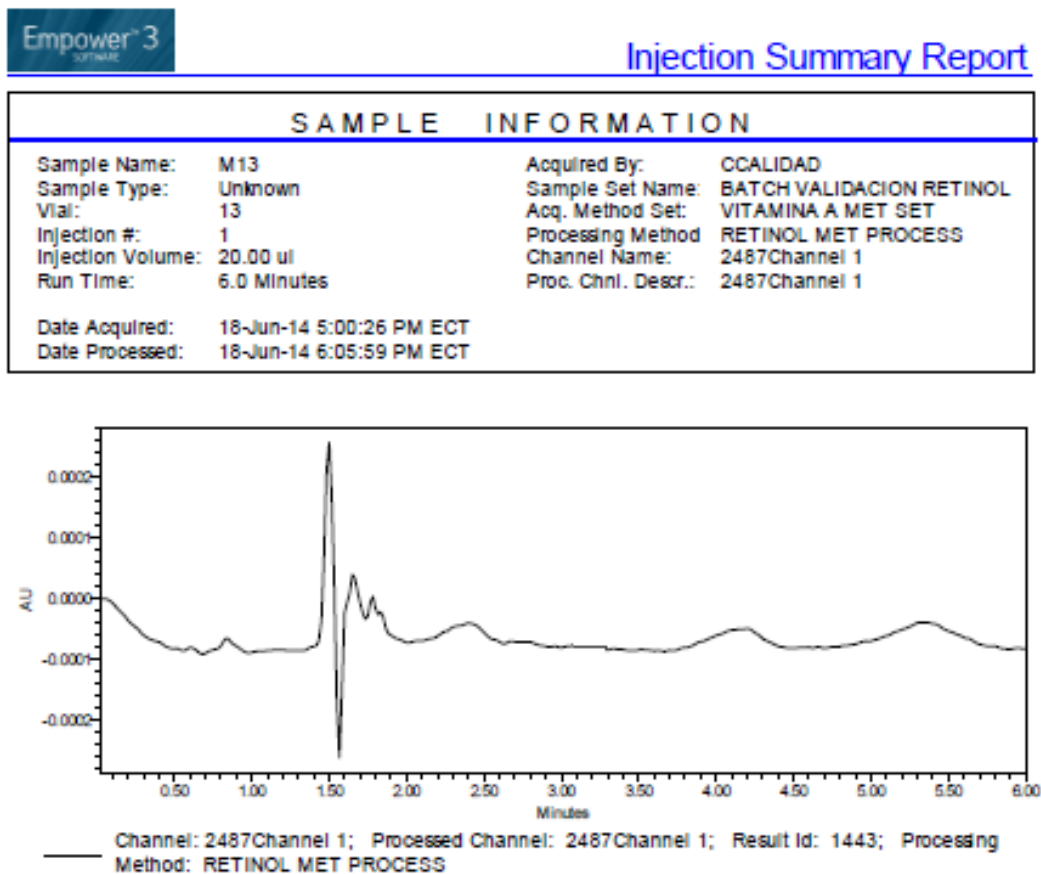
ANEXO 12. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE A LA FASE MOVIL



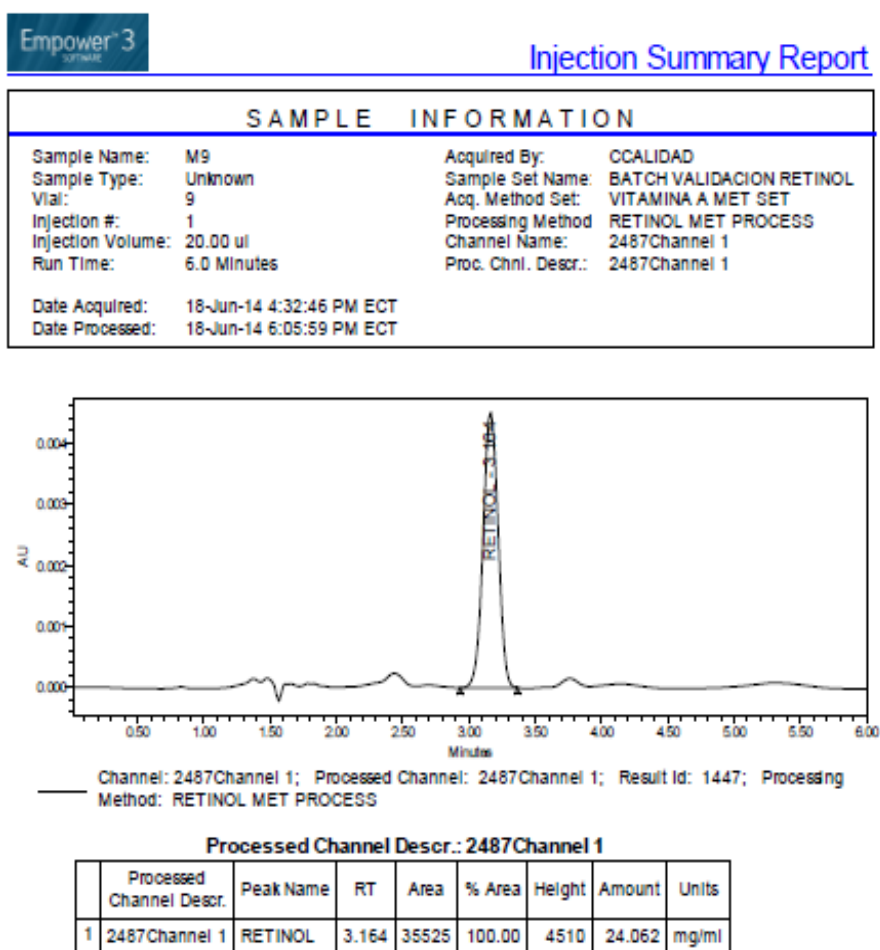
ANEXO 13. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE AL SOLVENTE



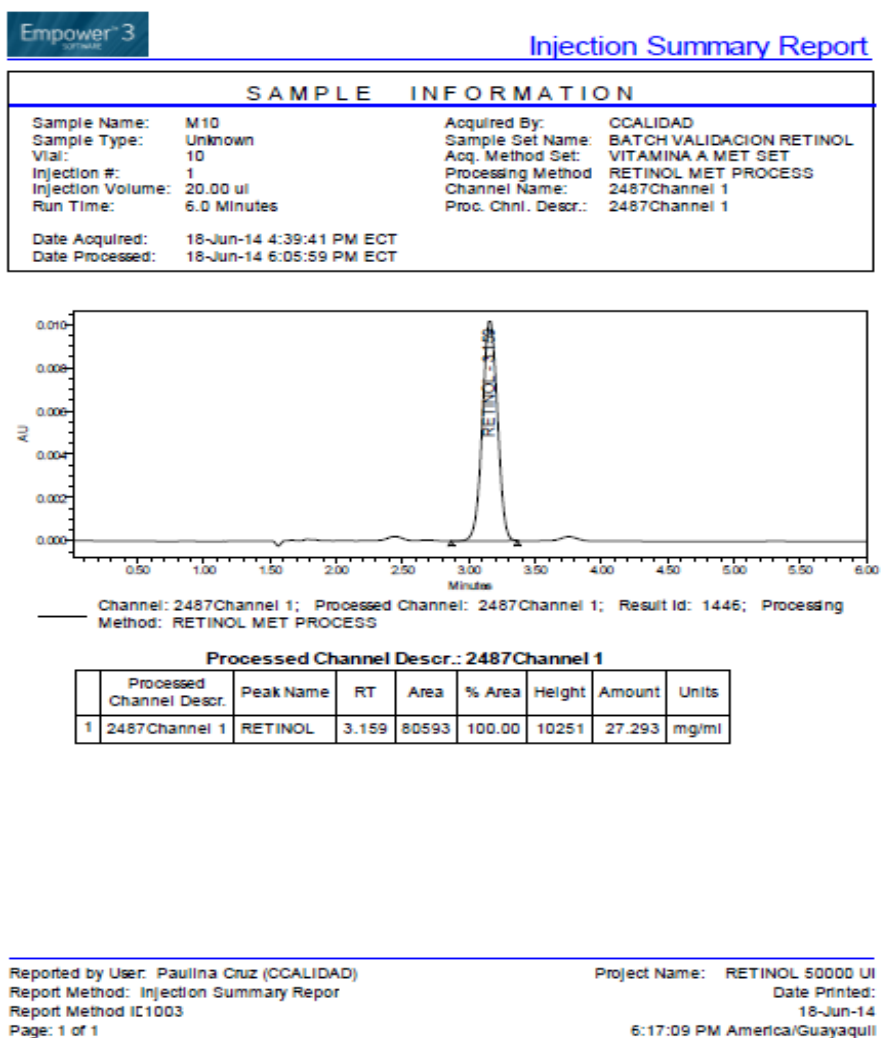
ANEXO 14. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD FRENTE AL PLACEBO



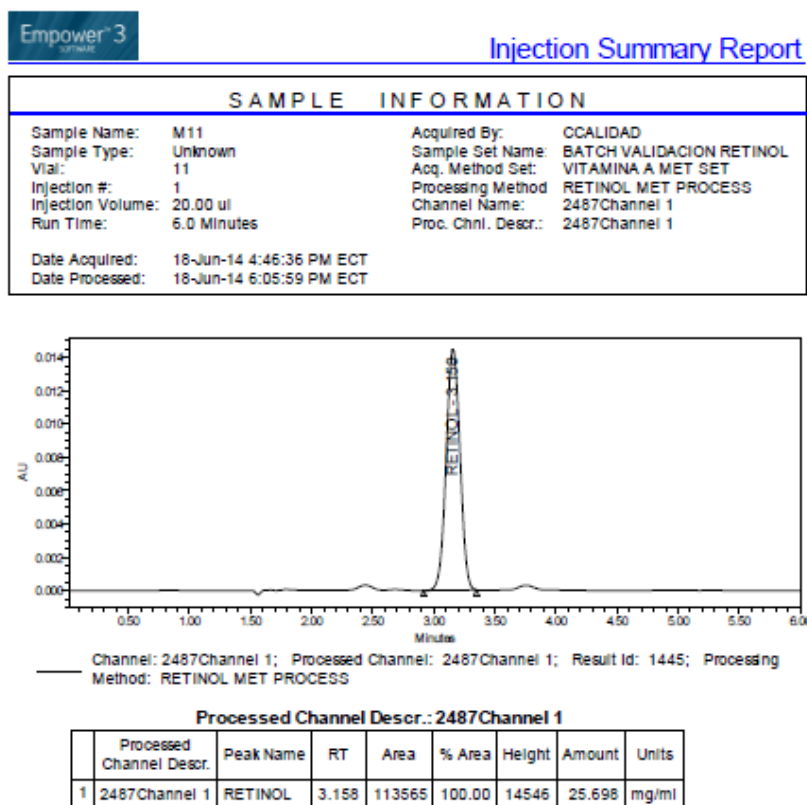
ANEXO 15. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 10%



ANEXO 16. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 20%



ANEXO 17. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 30%



Reported by User: Paulina Cruz (CCALIDAD)
 Report Method: Injection Summary Report
 Report Method ID: 1003
 Page: 1 of 1

Project Name: RETINOL 50000 UI
 Date Printed: 18-Jun-14
 6:17:13 PM America/Guayaquil

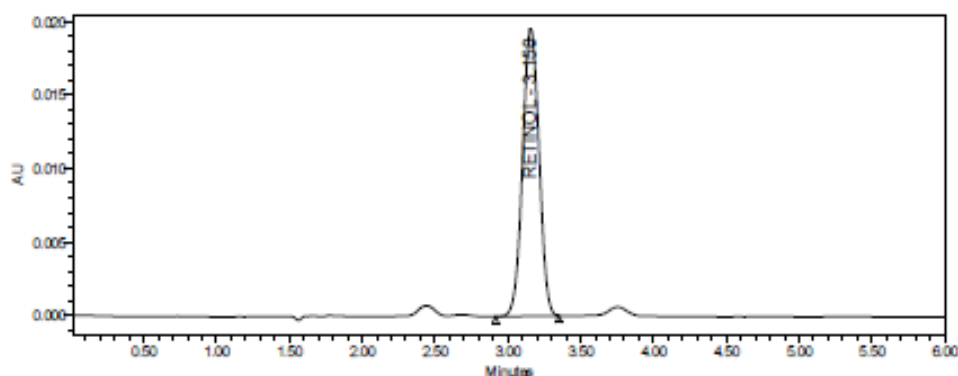
ANEXO 18. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN A CONCENTRACIÓN DEL 40%

Empower 3
SOFTWARE

Injection Summary Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	M12	Acquired By:	CCALIDAD
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	BATCH VALIDACION RETINOL
Vial:	12	Acq. Method Set:	VITAMINA A MET SET
Injection #:	1	Processing Method:	RETINOL MET PROCESS
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	6.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2487Channel 1
Date Acquired:	18-Jun-14 4:53:31 PM ECT		
Date Processed:	18-Jun-14 6:05:59 PM ECT		



Channel: 2487Channel 1; Processed Channel: 2487Channel 1; Result Id: 1444; Processing Method: RETINOL MET PROCESS


Processed Channel Descr.: 2487Channel 1

	Processed Channel Descr.	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	2487Channel 1	RETINOL	3.158	153205	100.00	19671	25.942	mg/ml

Reported by User: Paulina Cruz (CCALIDAD)
Report Method: Injection Summary Report
Report Method IC1003
Page: 1 of 1

Project Name: RETINOL 50000 UI
Date Printed:
18-Jun-14
6:17:17 PM America/Guayaquil

ANEXO 19. REVISIÓN TÉCNICA DEL PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

 Ginsberg Ecuador S.A.		Nº.:	AC-05-05-049.1
Protocolo de Validación		Pág.:	1 de 17
Dpto.:	CONTROL DE CALIDAD	Anexos:	2
Área:	VALIDACIONES	Vigencia:	06 – 2014
Tema:	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE METODO ANALITICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS	Próxima. Rev:	N/A
		Reemplaza a:	NUEVO

Preparado por: Rocío Morales
Analista Validaciones

18-06-2014 
Fecha Firma

Eva Guamán
Tesisista de Validaciones

18-06-2014 
Fecha Firma

Revisado por: Pedro Torres
Jefe Nacional de Validaciones

18-06-2014 
Fecha Firma

Revisado por: Mabel Vera
Jefe Control de Calidad


18-06-2014 
Fecha Firma

Aprobado por: Jeannette Checa
Dirección Técnica Quito

18-06-2014 
Fecha Firma

Este es un documento confidencial propiedad de GINSBERG ECUADOR S.A.

ANEXO 20. REVISIÓN TÉCNICA DEL INFORME DE VALIDACIÓN

 Ginsberg Ecuador S.A.		Nº.:	AC-06-05-INF-206.01
Informe de Validación		Pág.:	1 de 19
Dpto.:	CONTROL DE CALIDAD	Anexos:	1
Área:	VALIDACIONES	Vigencia:	06 – 2014
Tema:	VALIDACIÓN DE METODO ANALITICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS	Próxima. Rev:	06 – 2017
		Reemplaza a:	NUEVO

Preparado por: Rocío Morales
Analista Validaciones

24-06-2014
Fecha


Firma

Eva Guamán
Tesisista de Validaciones

24-06-2014
Fecha


Firma

Revisado por: Pedro Torres
Jefe Nacional de Validaciones

24-06-2014
Fecha


Firma

Revisado por: Mabel Vera
Jefe Control de Calidad

24-06-2014
Fecha


Firma

Aprobado por: Jeannette Checa
Dirección Técnica Quito

24-06-2014
Fecha


Firma

Este es un documento confidencial propiedad de GINSBERG ECUADOR S.A.

ANEXO 21. CERTIFICADO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

VALIDACIÓN DEL METODO DE VALORACIÓN POR HPLC DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS

DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

Conforme a la documentación desarrollada los esquemas y memoria técnica presentadas,
**SE DECLARA QUE EL METODO DE VALORACION DE VITAMINA A ACETATO EN
RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS SE ENCUENTRA VALIDADO.**

DIRECCION TECNICA:



FECHA:

24-06-2014

VALIDACIONES:



FECHA:

24-06-2014



FOTOGRAFÍA N° 1. EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)



FOTOGRAFÍA N° 2. BALANZA OHAUS. ÁREA FÍSICO QUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO



FOTOGRAFÍA N° 3. ULTRASONIDO. ÁREA FÍSICO QUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO



FOTOGRAFÍA N° 4. BOMBA AL VACÍO. ÁREA FÍSICO QUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO



FOTOGRAFÍA N° 5. MILLI-Q. ÁREA FÍSICO QUÍMICA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO

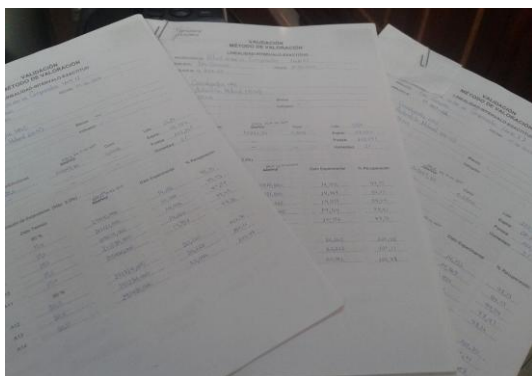


FOTOGRAFÍA N° 6. COMPRIMIDOS DE RETINOL PRODUCIDO POR GINSBERG ECUADOR S.A.

Ginsberg Ecuador S.A.		N°	Actualizado
Protocolo de Validación		1	1 de 12
CONTROL DE CALIDAD		1	1 de 12
VALIDACIONES		1	1 de 12
Título: VALIDACIÓN DE METODO ANALITICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS		1	1 de 12
Tema: VALIDACIÓN DE METODO ANALITICO DE VITAMINA A ACETATO EN RETINOL 50.000 UI COMPRIMIDOS		1	1 de 12
Preparado por: Rocio Morales		1	1 de 12
Analista Validaciones		1	1 de 12
Eva Guzmán		1	1 de 12
Técnica de Validaciones		1	1 de 12
Revisado por: Pedro Torres		1	1 de 12
Jefe Nacional de Validaciones		1	1 de 12
Revisado por: Mabel Vera		1	1 de 12
Jefe Control de Calidad		1	1 de 12
Aprobado por: Jeannette Chica		1	1 de 12
Dirección Técnica Quito		1	1 de 12

Este es un documento confidencial propiedad de GINSBERG ECUADOR S.A.

FOTOGRAFÍA N° 7. DOCUMENTOS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN



FOTOGRAFÍA N° 8. HOJAS DE TRABAJO UTILIZADOS EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN



FOTOGRAFÍA N° 9. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS